

ANALOGUES PEPTIDIQUES COMPRENANT AU MOINS UN RESIDU AZA- β^3 -AMINOACYLE, ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT EN THERAPIE

5 La présente invention a pour objet des analogues de peptides ou protéines parents, ces analogues peptidiques, comprenant au moins un résidu aza- β^3 aminoacyle, ainsi que leurs utilisations dans des compositions pharmaceutiques ou pour le diagnostic de pathologies dans lesquelles sont impliqués les peptides ou protéines parents
10 susmentionnés.

L'identification des régions antigéniques (ou épitopes) reconnues par les cellules T et la compréhension des bases moléculaires et cellulaires de la reconnaissance antigéniques sont considérées comme des étapes clés dans la conception et le développement de stratégies vaccinales et d'immunomodulation. L'immunisation à l'aide
15 de peptides correspondant à des épitopes du non-soi (par exemple viraux, bactériens) ou du soi (par exemple tumoraux) pour induire des anticorps et/ou des lymphocytes T auxiliaires (Th) ou des lymphocytes cytotoxiques (CTL) spécifiques de la tumeur ou du virus, est aujourd'hui une stratégie particulièrement prometteuse dans le développement de vaccins synthétiques. Dans le cas des vaccins antiviraux par exemple, les peptides
20 présentent plusieurs avantages majeurs sur les préparations traditionnelles de virus atténués ou inactivés, à savoir une production plus simple, chimiquement définie et parfaitement contrôlable, ainsi qu'une meilleure stabilité à température ambiante. Des approches thérapeutiques basées sur des épitopes T CD4⁺ d'antigènes du soi sont aussi proposées.

25 En pratique, cependant, les peptides se révèlent souvent peu immunogènes et ne permettent pas d'obtenir des titres élevés d'anticorps capables de réagir avec la protéine native ou la particule virale. Ces limitations à l'utilisation des peptides dans le développement de vaccins synthétiques sont probablement liées à une biodégradabilité importante dans les fluides biologiques, une mauvaise diffusion à travers les systèmes
30 membranaires et par le manque de sélectivité vis-à-vis de la cible.

Différentes approches ont été développées pour "transformer" les peptides en molécules capables d'induire une réponse immune humorale ou cellulaire plus forte et plus spécifique. L'introduction dans des peptides antigéniques de liaisons pseudopeptidiques est une stratégie des plus intéressantes pour améliorer leurs

caractéristiques physico-chimiques propres et leur aptitude à interagir avec les effecteurs du système immunitaire. Malgré les applications potentielles importantes dans le domaine du diagnostic, de la vaccination ou de l'immunomodulation, et l'étendue des connaissances de ces analogues acquises dans des domaines chimique et pharmacologique, les pseudopeptides sont encore peu utilisés en immunologie.

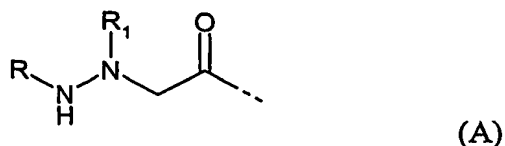
La présente invention a pour but de fournir des analogues peptidiques résistants aux enzymes de dégradation, et capables de mimer l'activité de divers peptides natifs, agents de vaccination ou d'immunomodulation.

L'invention a plus particulièrement pour but de fournir des analogues peptidiques qui se caractérisent par l'introduction de monomères, ne présentant pas de centres chiraux carbonés, ce qui permet de s'affranchir des difficultés liées à la synthèse asymétrique et aux problèmes d'épimérisation. Cette famille d'analogues peptidiques constitue une nouvelle classe de peptidomimétiques, dans lesquels les résidus (chaînes latérales) sont portés par des atomes d'azote chiraux à configuration non fixée, ce qui leur confère une grande adaptabilité spatiale. Le positionnement correct des peptidomimétiques construits selon ce principe, dans un site enzymatique se produit à la fois par le déplacement d'équilibres conformationnel et configurationnel. L'action d'un tel composé, d'un point de vue stéréochimique, est équivalente à celle d'un mélange de diastéréoisomères en équilibre rapide, l'interaction avec le site enzymatique déplaçant l'équilibre vers le ou les stéréoisomères les plus affins. D'autres bénéfices potentiels peuvent également en résulter, tels que, d'un point de vue chimique, une simplification des méthodes de synthèse (suppression des problèmes stéréochimiques), et d'autre part, une plus grande résistance de tels analogues aux squelettes modifiés, vis-à-vis de l'action des peptidases. La synthèse préalable de ces monomères, autorise l'introduction d'une bonne diversité de chaînes latérales, aussi bien en série protéogénique que non protéogénique, et donc permet de moduler dans une certaine mesure, leur affinité et leur lipophilie.

L'invention a également pour but de fournir des compositions pharmaceutiques comprenant de tels analogues peptidiques, ainsi que des méthodes de diagnostic *in vitro* de pathologies impliquant les peptides parents dont sont issus ces analogues peptidiques, et des kits pour la mise en oeuvre de ces méthodes.

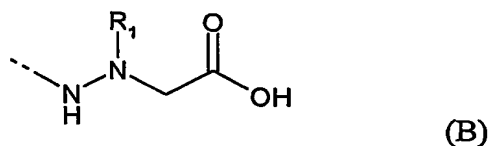
La présente invention a pour objet l'utilisation d'analogues de peptides ou protéines parents, ces analogues peptidiques, encore désignés peptides hybrides, comprenant au moins un résidu aza- β^3 -aminoacyle, à savoir :

- un résidu répondant à la formule (A) suivante lorsqu'il est situé en position N-terminale,



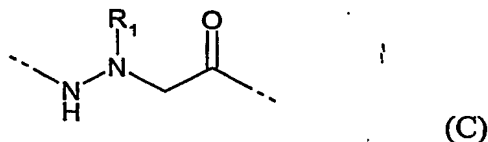
dans laquelle R représente H ou un groupe protecteur de la fonction amine des aminoacides, tels que Fmoc (fluorénylméthyloxycarbonyle), Boc (tertio-butyloxycarbonyle), ou Z (benzyloxycarbonyle), et R₁ représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

- un résidu répondant à la formule (B) suivante lorsqu'il est situé en position C-terminale,



dans laquelle R₁ représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

- un résidu répondant à la formule (C) suivante lorsqu'il est situé dans la chaîne desdits peptides hybrides,



dans laquelle R₁ représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

pour la préparation:

- d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies associées à la présence, dans l'organisme d'un individu, d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, ou

- d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies impliquant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et/ou les récepteurs des cellules T, ou

5 - d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un individu d'un anticorps susceptible d'être reconnu par un susdit peptide hybride,

ou pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* des pathologies susmentionnées.

10 Les peptides hybrides susmentionnés de l'invention, peuvent également être définis par la formule générale suivante (A) :

AA1-(AA2-.....-AAn-1)-AAn (A)

dans laquelle :

* AA1 à AAn représentent :

15 - un aminoacide correspondant à un résidu aminoacyle situé à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,

20 - ou un résidu monomère aza- β^3 aminoacyle analogue au résidu aminoacyle initialement présent à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, ledit monomère aza- β^3 aminoacyle répondant aux formules (A), (B), ou (C) indiquées ci-dessus, suivant qu'il soit respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits peptides hybrides, et dans lesquelles R₁ est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent ledit monomère aza- β^3 aminoacyle,

* et n représente un nombre entier de 4 à environ 100.

25 La présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de peptides hybrides tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies d'origine virale ou bactérienne, ou de pathologies autoimmunes, ou de maladies neurodégénératives.

30 La présente invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée de peptides hybrides tels que définis ci-dessus, dans laquelle les pathologies sont choisies parmi :

- les pathologies impliquant des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et/ou les récepteurs des cellules T,

• les maladies auto-immunes, et notamment la thyroïdite de Hashimoto, la maladie de Basedow, la maladie d'Addison, l'insuffisance hypophysaire, la gastrite de Biermer, certaines stérilités, le diabète juvénile de type 1, le syndrome de Goodpasture, la myasthénie, le rhumatisme articulaire aigu, le pemphigus, la pemphigoïde bulleuse, la dermatite herpétiforme, le vitiligo, le pelade, le psoriasis, l'ophtalmie sympathique, l'uvéïte, le syndrome de Guillain-Baré, la sclérose en plaques, l'anémie hémolytique, le purpura thrombopénique idiopathique, la leucopénie idiopathique, la cirrhose biliaire primitive, l'hépatite chronique active, la rectocolite hémorragique, l'iléite de Crohn, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde, la dermatopolymyosite, la sclérodermie, la connectivite mixte, le lupus érythémateux discoïde, le lupus érythémateux disséminé.

• les maladies neurodégénératives,

• les maladies d'origine virale, notamment :

– le SIDA provoqué par le virus de l'immuno-déficience humaine HIV-1 et HIV-2,

– la paraplégie associée à HTVL-1, ou la leucémie à cellules T de l'adulte, provoquée par le virus de la leucémie humaine à cellules T (virus HTLV),

– les infections provoquées par le virus respiratoire syncytial,

– les infections provoquées par le virus coxsackie, par exemple les méningites aiguës lymphocytaires,

– les infections provoquées par le virus d'Epstein-Barr, par exemple la mononucléose infectieuse,

– les infections provoquées par le cytomégalovirus, par exemple la maladie des inclusions cytomégaliqes,

– l'herpès provoqué par le virus de l'herpès humain,

– l'herpès provoqué par le virus 6 de l'herpès simplex,

– les infections provoquées par le parvovirus B19 humain, par exemple les gastro-entérites infectieuses,

– l'hépatite B provoquée par le virus de l'hépatite B,

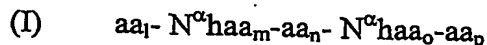
– l'hépatite C provoquée par le virus de l'hépatite C,

– la grippe provoquée par le virus influenza,

– la rubéole provoquée par le virus de la rubéole,

- les infections provoquées par le virus de la Dengue, par exemple les arboviroses,
- les rhumes, rhinites, coryza provoqués par les rhinovirus,
- la fièvre aphteuse provoquée par le virus de la fièvre aphteuse,
- 5 - certains cancers liés à des virus, tels que les virus Papilloma.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de peptides hybrides de formule (I) suivante :



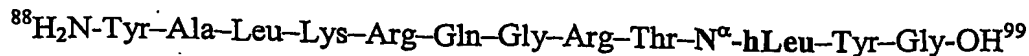
dans laquelle :

- 10 - aa_1 , aa_n et aa_p représentent un résidu aminoacyle, ou un enchaînement de résidus aminoacyles, correspondant aux résidus aminoacyles présents aux mêmes positions dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,
- $N^{\alpha}haa_m$ et $N^{\alpha}haa_o$ représentent un résidu monomère aza- β^3 aminoacyle, ou un enchaînement de résidus monomères aza- β^3 aminoacyles analogues aux résidus
15 aminoacyles initialement présents à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, lesdits monomères aza- β^3 aminoacyles répondant aux formules (A), (B), ou (C) indiquées ci-dessus, suivant qu'ils soient respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits peptides hybrides, et dans lesquelles R_1 est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial
20 du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent lesdits monomères aza- β^3 aminoacyles,
- 1 , m , n , o , et p représentent zéro, ou un nombre entier compris entre 1 et 20, sous réserve que l'un au moins de m ou de o soit différent de zéro, et que le nombre minimum de résidus dans lesdits peptides hybrides de formule (I) soit de 4.

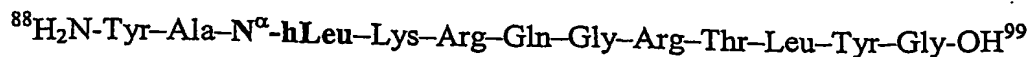
25 L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de peptides hybrides issus de l'épitope 88-99 de l'histone H4 à titre de peptide parent, et correspondant à SEQ ID NO : 1, dont l'un au moins des acides aminés initiaux est substitué par un résidu analogue aza- β^3 acide aminé, pour la préparation d'un médicament, ou vaccin, destiné à la prévention ou au traitement du lupus érythémateux
30 disséminé.

A ce titre l'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de peptides hybrides issus de l'épitope 88-99 défini ci-dessus, et ayant les formules suivantes :

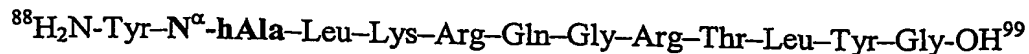
- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



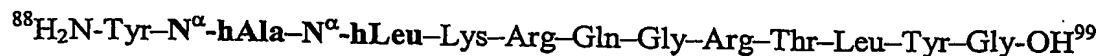
- SEQ ID NO : 3 (ou peptide C):



5 - SEQ ID NO : 4 (ou peptide A):



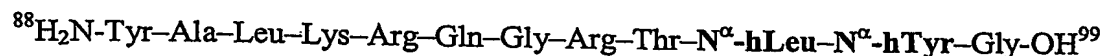
- SEQ ID NO : 5 (ou peptide B):



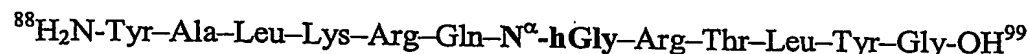
- SEQ ID NO : 6 (ou peptide D):



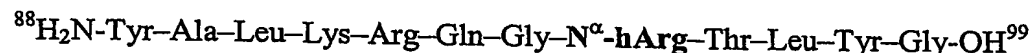
- SEQ ID NO : 7 (ou peptide G):



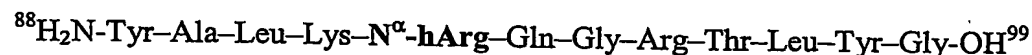
- SEQ ID NO : 8 :



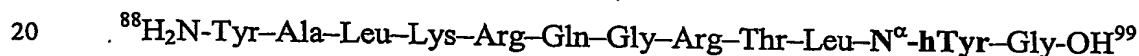
15 - SEQ ID NO : 9 :



- SEQ ID NO : 10 :



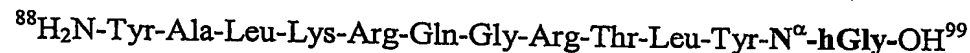
- SEQ ID NO : 11 :



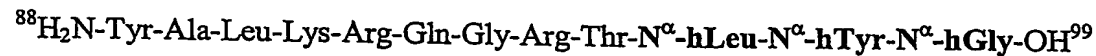
- SEQ ID NO : 12 (ou peptide F):



- SEQ ID NO : 13 (ou peptide H):



25 - SEQ ID NO : 14 (ou peptide I):



L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée du peptide hybride de formule SEQ ID NO : 2.

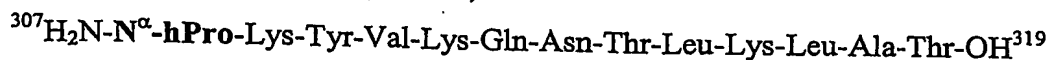
L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée du peptide hybride de formule SEQ ID NO : 7.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de peptides hybrides issus du peptide 307-319 de l'hémagglutinine du virus de la grippe à titre de peptide parent, et correspondant à SEQ ID NO : 15, dont l'un au moins des

aminoacides initiaux est substitué par un résidu analogue aza- β^3 aminoacide, pour la préparation d'un médicament, ou vaccin, destiné à la prévention ou au traitement de la grippe ou de toute autre pathologie telle que listée ci-dessus et pour laquelle une molécule contenant un épitope B ou CTL (CD8) est administrée en association avec la

A ce titre l'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de peptides hybrides ayant les formules suivantes :

– SEQ ID NO : 16 (ou peptide A') :



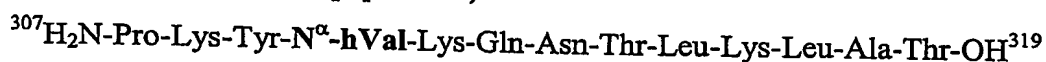
– SEQ ID NO : 17 (ou peptide B') :



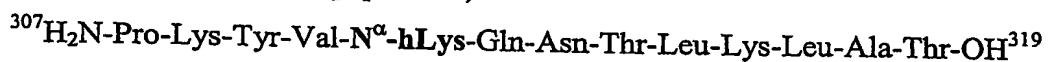
– SEQ ID NO : 18 (ou peptide C') :



– SEQ ID NO : 19 (ou peptide D') :



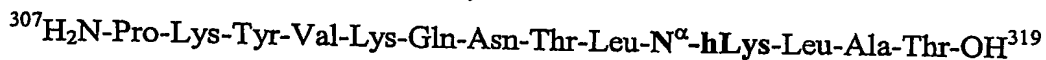
– SEQ ID NO : 20 (ou peptide E') :



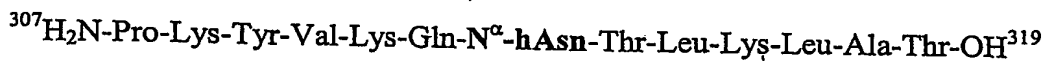
– SEQ ID NO : 21 (ou peptide F') :



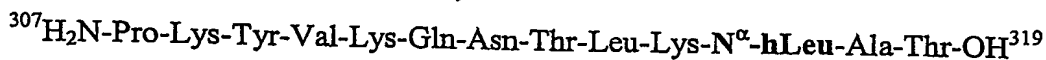
– SEQ ID NO : 22 (ou peptide G') :



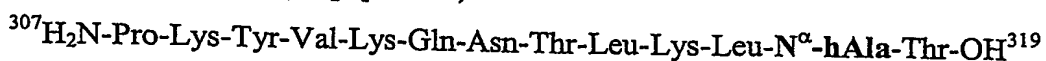
– SEQ ID NO : 23 (ou peptide H') :



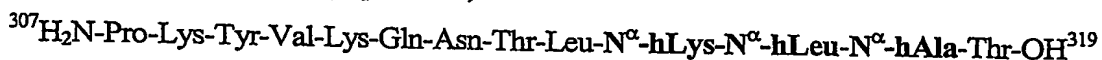
– SEQ ID NO : 24 (ou peptide I') :



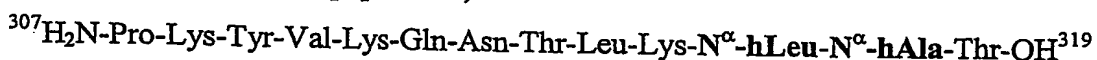
– SEQ ID NO : 25 (ou peptide J') :



– SEQ ID NO : 26 (ou peptide K') :



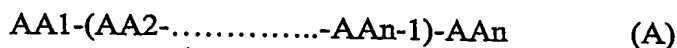
– SEQ ID NO : 27 (ou peptide L') :



L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée du peptide hybride de formule SEQ ID NO : 25.

L'invention a également pour objet les peptides hybrides comprenant au moins un aza- β^3 aminoacide, ces peptides hybrides étant des analogues de peptides ou protéines parents, lesdits peptides hybrides comprenant au moins un aminoacide initial du peptide ou de la protéine parent.

L'invention concerne plus particulièrement les peptides hybrides tels que définis ci-dessus, et correspondant à la formule générale suivante (A) :



dans laquelle :

* AA1 à AA_n représentent :

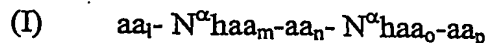
- un aminoacide correspondant à un résidu aminoacycle situé à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,

- ou un résidu monomère aza- β^3 aminoacycle analogue au résidu aminoacycle initialement présent à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, ledit monomère aza- β^3 aminoacycle répondant aux formules (A), (B), ou (C) indiquées ci-dessus, suivant qu'il soit respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits peptides hybrides, et dans lesquelles R₁ est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent ledit monomère aza- β^3 aminoacycle,

l'un au moins de AA1 à AA_n représentant un aminoacide du peptide parent, à savoir un résidu aminoacycle situé à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,

* et n représente un nombre entier de 4 à environ 100.

A ce titre l'invention concerne plus particulièrement les peptides hybrides définis ci-dessus de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- aa₁, aa_n et aa_p représentent un résidu aminoacycle, ou un enchaînement de résidus aminoacycles, correspondant aux résidus aminoacycles présents aux mêmes positions dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,

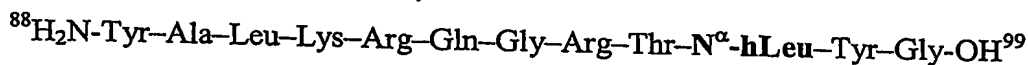
- N^αhaa_m et N^αhaa_o représentent un résidu monomère aza- β^3 aminoacycle, ou un enchaînement de résidus monomères aza- β^3 aminoacycles, analogues aux résidus aminoacycles initialement présents à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, lesdits monomères aza- β^3 aminoacycles

répondant aux formules (A), (B), ou (C) mentionnées ci-dessus, suivant qu'ils soient respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits peptides hybrides, et dans lesquelles R_1 est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent lesdits monomères aza- β^3 aminoacyles,

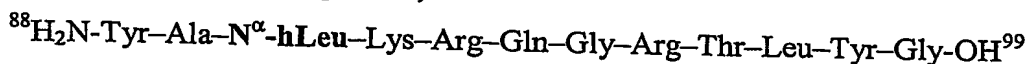
- l, m, n, o, et p représentent zéro, ou un nombre entier compris entre 1 et 20, sous réserve que l'un au moins de m ou de o soit différent de zéro, que le nombre minimum de résidus dans lesdits peptides hybrides de formule (I) soit de 4, et l'un au moins de l, n, ou p soit différent de zéro.

L'invention a plus particulièrement pour objet les peptides hybrides susmentionnés de formules suivantes :

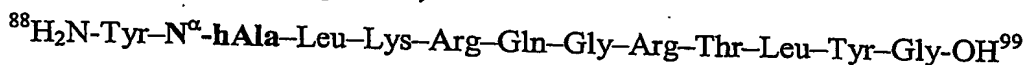
- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



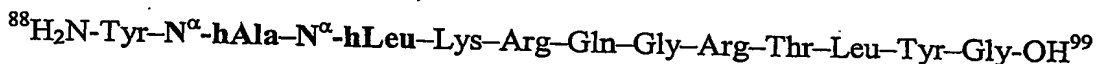
- SEQ ID NO : 3 (ou peptide C):



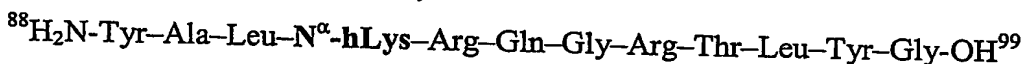
- SEQ ID NO : 4 (ou peptide A):



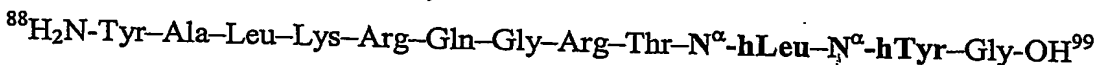
- SEQ ID NO : 5 (ou peptide B):



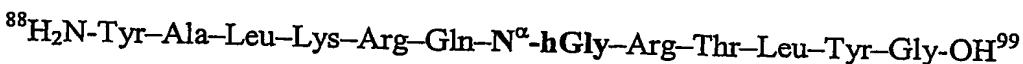
- SEQ ID NO : 6 (ou peptide D):



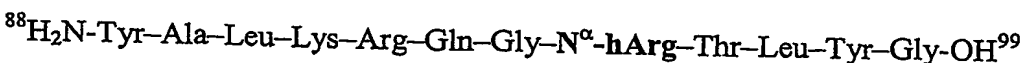
- SEQ ID NO : 7 (ou peptide G):



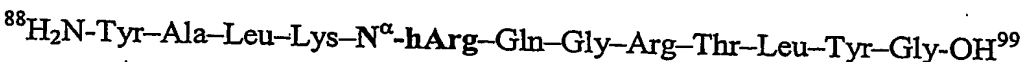
- SEQ ID NO : 8 :



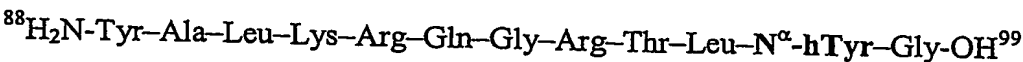
- SEQ ID NO : 9 :



- SEQ ID NO : 10 :



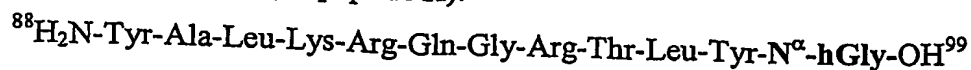
- SEQ ID NO : 11 :



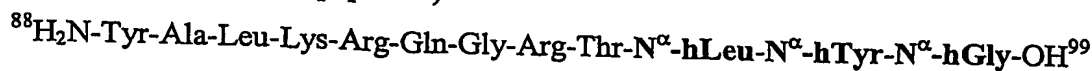
- SEQ ID NO : 12 (ou peptide F):



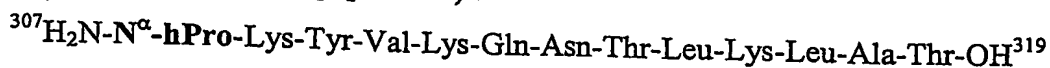
– SEQ ID NO : 13 (ou peptide H):



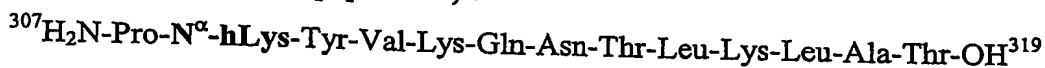
– SEQ ID NO : 14 (ou peptide I):



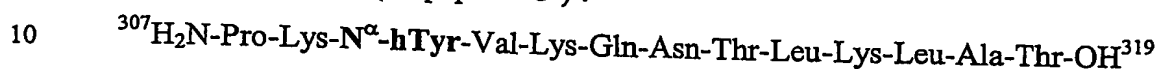
5 – SEQ ID NO : 16 (ou peptide A') :



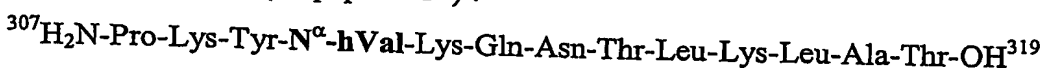
– SEQ ID NO : 17 (ou peptide B') :



– SEQ ID NO : 18 (ou peptide C') :



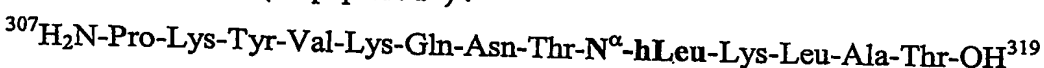
– SEQ ID NO : 19 (ou peptide D') :



– SEQ ID NO : 20 (ou peptide E') :



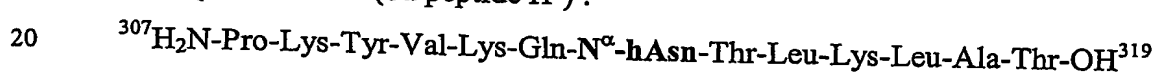
15 – SEQ ID NO : 21 (ou peptide F') :



– SEQ ID NO : 22 (ou peptide G') :



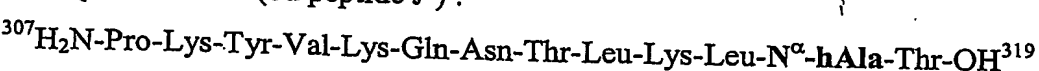
– SEQ ID NO : 23 (ou peptide H') :



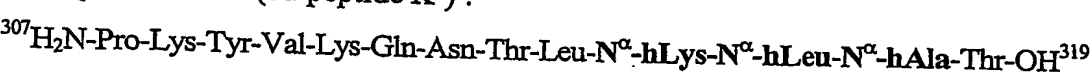
– SEQ ID NO : 24 (ou peptide I') :



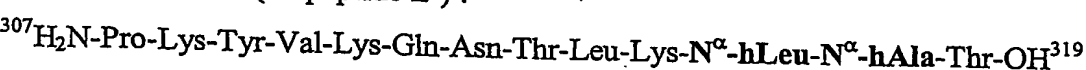
– SEQ ID NO : 25 (ou peptide J') :



25 – SEQ ID NO : 26 (ou peptide K') :



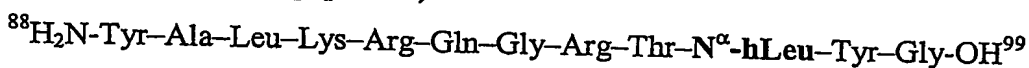
– SEQ ID NO : 27 (ou peptide L') :



L'invention concerne plus particulièrement encore les peptides hybrides tels que
définis ci-dessus de formule suivante:

30

- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):



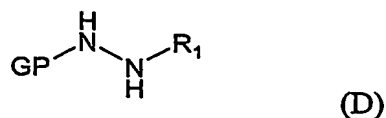
- SEQ ID NO : 7 (ou peptide G) :

⁸⁸H₂N-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-N^α-hLeu-N^α-hTyr-Gly-OH⁹⁹

- SEQ ID NO : 25 (ou peptide J') :

³⁰⁷H₂N-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-N^α-hAla-Thr-OH³¹⁹

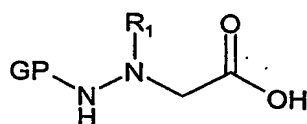
L'invention concerne également un procédé de préparation d'aza-β³ aminoacides
 5 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de l'hydrazine substituée et
 protégée de formule (D) suivante :



10 dans laquelle R représente une chaîne latérale choisie parmi celles des
 aminoacides, le cas échéant protégée, et GP un groupe protecteur des fonctions amines,
 tels que Boc, Fmoc, ou Z,

avec de l'acide glyoxylique sous agitation en présence de NaBH₃CN en milieu
 acide,

15 ce qui conduit en une étape au composé azaβ³ aminoacide de formule



20 dans laquelle R et GP sont tels que définis ci-dessus, ledit composé pouvant le cas
 échéant être déprotégé, notamment à l'aide de HCl, de pipéridine, ou d'hydrogène
 palladié, afin d'éliminer le groupe GP (Boc, Fmoc, ou Z) et le remplacer par H.

L'invention concerne plus particulièrement les aza-β³ aminoacides suivants :

Fmoc aza-β³-Glycine (Fmoc-N^αhGly-OH),

Fmoc aza-β³-Alanine (Fmoc-N^αhAla-OH),

25 Fmoc aza-β³-Leucine (Fmoc-N^αhLeu-OH),

Fmoc aza-β³-Valine (Fmoc-N^αhVal-OH),

Fmoc aza-β³-Lysine (Fmoc-N^αhLys(Boc)-OH),

Fmoc -aza-β³-Aspartique acide (Fmoc-N^αhAsp(OtBu)-OH),

Fmoc aza-β³-Methionine (Fmoc-N^αhMet-OH),

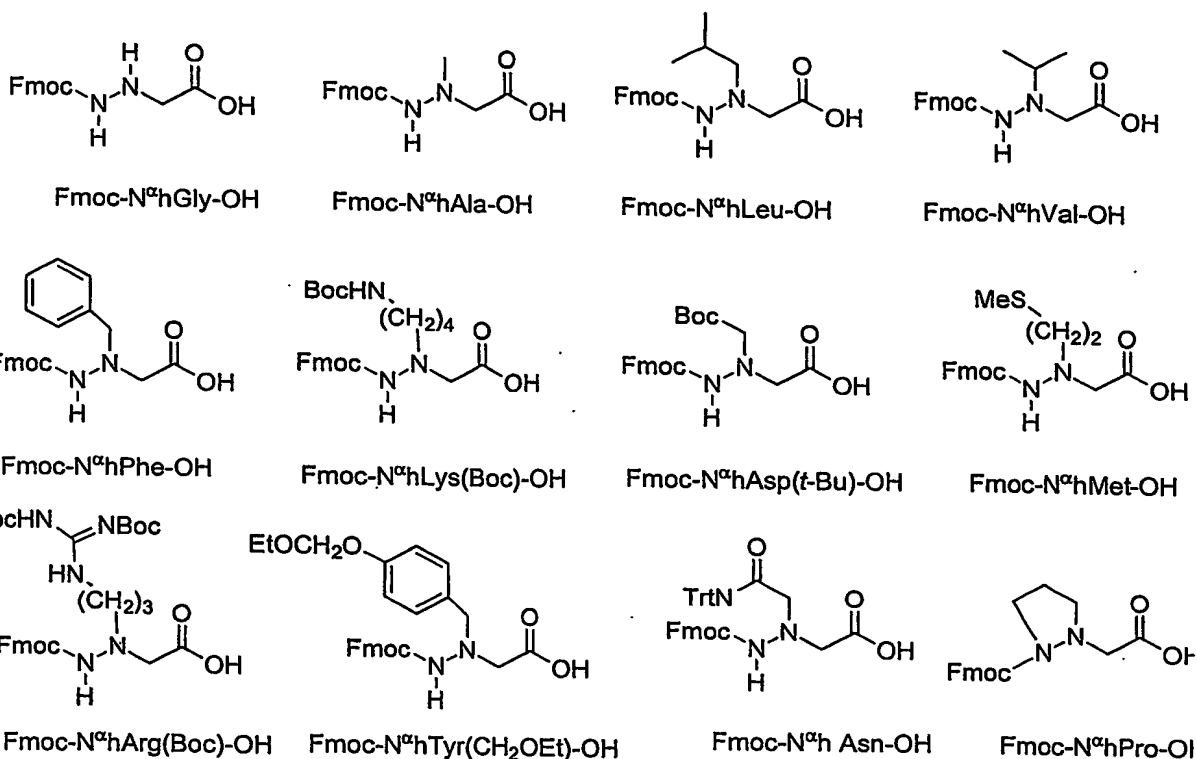
30 Fmoc aza-β³ Arginine (Fmoc-N^αhArg (Boc)-OH),

Fmoc aza- β^3 -Tyrosine (Fmoc-N $^{\alpha}$ hTyr(OCH₂OEt)-OH)

Fmoc aza- β^3 -Asn (Fmoc-N $^{\alpha}$ hAsn(Trt)-OH).

Fmoc aza- β^3 -Pro (Fmoc-N $^{\alpha}$ hPro-OH).

dont les formules sont respectivement les suivantes :



5

L'invention concerne également les complexes entre un peptide hybride tel que défini ci-dessus, et un élément du complexe d'histocompatibilité majeur (encore désigné complexe MHC-hybride), et éventuellement un récepteur de cellules T (encore désigné complexe MHC-hybride-récepteur T).

10

L'invention concerne plus particulièrement un complexe entre un peptide hybride tel que défini ci-dessus, et un récepteur de cellules T.

L'invention a également pour objet une méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient, d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, caractérisée en ce qu'elle comprend:

15

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient susceptible d'être porteur d'anticorps dirigé contre ladite protéine, avec un peptide hybride tel que

défini ci-dessus, ledit peptide hybride étant issu de tout ou partie de ladite protéine endogène ou exogène, ou issu d'un peptide susceptible d'être reconnu par des anticorps reconnaissant eux-mêmes la protéine exogène ou endogène, dans des conditions permettant la réaction entre les anticorps dirigés contre la protéine et susceptibles d'être
5 présents dans l'échantillon biologique, et le susdit peptide hybride;

- la détection *in vitro* du complexe antigène / anticorps susceptible d'être formé à l'étape précédente ou

- la détection *in vitro* d'anticorps circulants chez le patient par un test de compétition en utilisant un anticorps anti-hybride.

10 L'invention a également pour objet un nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* telle que définie ci-dessus, comprenant:

- un peptide hybride issu de tout ou partie de la protéine endogène ou exogène, ou correspondant à un peptide susceptible d'être reconnu par des anticorps reconnaissant eux-mêmes la protéine exogène ou endogène,

15 - des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique,

- des réactifs permettant de détecter le complexe antigène / anticorps qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus
20 particulièrement dans le cas où le peptide hybride ou les anticorps anti-hybrides susmentionnés ne sont pas marqués.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, notamment les vaccins, comprenant au moins un peptide hybride tel que défini ci-dessus, en association ou non avec un véhicule physiologiquement acceptable.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet les compositions pharmaceutiques susmentionnées comprenant au moins un peptide hybride tel que défini ci-dessus, associé ou non à une molécule porteuse, protéique ou non, pouvant induire *in vivo* la production d'anticorps neutralisant la protéine exogène ou endogène responsable de la pathologie, ou induire *in vivo* une réponse immune cellulaire cytotoxique ou auxiliaire.

30 L'invention concerne également les anticorps anti-peptides hybrides polyclonaux ou monoclonaux tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un peptide hybride défini ci-dessus, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces peptides hybrides, et/ou avec les peptides ou protéines parents correspondant à ces derniers, et caractérisés en ce qu'ils reconnaissent le peptide parent

ou la protéine parente avec une affinité au moins égale à celle présentée par les anticorps anti-peptide parent ou anti-protéine parente vis à vis du peptide parent ou de la protéine parente.

L'invention a plus particulièrement pour objet les anticorps anti-idiotypes susceptibles de former un complexe avec les anticorps susmentionnés, tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec lesdits anticorps.

L'invention concerne également une méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient susceptible d'être porteur de ladite protéine, avec l'un au moins des anticorps susmentionnés, les anticorps étant avantageusement dirigés contre un peptide hybride issu de tout ou partie de ladite protéine endogène ou exogène, ou

dans des conditions permettant la réaction entre la protéine susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et les susdits anticorps dirigés contre le susdit peptide hybride;

- la détection *in vitro* du complexe antigène / anticorps susceptible d'être formé à l'étape précédente.

L'invention a également pour objet un nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* telle que définie ci-dessus, comprenant:

- des anticorps susmentionnés, dirigés contre ce peptide hybride;
- des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique;

- des réactifs permettant de détecter le complexe antigène / anticorps qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où le peptide hybride ou les anticorps anti-hybrides susmentionnés ne sont pas marqués.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, notamment les vaccins, comprenant au moins un anti-idiotype susmentionné, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

L'invention a plus particulièrement pour objet les compositions pharmaceutiques susmentionnées comprenant au moins un anti-idiotype tel que défini ci-dessus, associé à une molécule porteuse, protéique ou non, pouvant induire *in vivo* la production d'anticorps neutralisant la protéine exogène ou endogène responsable de la pathologie, ou induire *in vivo* une réponse immune cellulaire cytotoxique.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, comprenant des anticorps tels que définis ci-dessus, en association ou non avec un véhicule physiologiquement acceptable.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la synthèse d'aza- β^3 aminoacides, et de peptides hybrides les contenant, ainsi que de leur activité biologique.

D) Peptides hybrides de l'histone H4.

La séquence sur laquelle les Inventeurs ont travaillé dans un premier temps est un peptide de l'histone H4 (résidus 88-99: YALKRQGR^TLYG) qui représente un épitope T CD4⁺ immunodominant minimum reconnu par des cellules Th ganglionnaires de souris immunisées contre du nucléosome, structure de base de la chromatine, formée d'ADN et des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4. Il a été démontré ces dernières années que le nucléosome joue un rôle primordial en tant qu'antigène et immunogène dans une maladie autoimmune systémique, le lupus érythémateux disséminé, qui touche aujourd'hui 1 million d'Américains. Ce peptide de la région C-terminale de l'histone H4 a l'importante propriété de ne pas être reconnu par des cellules Th générées contre la protéine H4 isolée, mais seulement par les cellules Th générées contre le nucléosome. Des études détaillées de ce peptide chez la souris normale BALB/c et à l'aide d'un modèle murin de lupus (souris NZBxNZW) ont permis d'obtenir des informations concernant la réponse cellulaire T CD4⁺ et B (production d'anticorps) dirigées contre ce peptide.

La synthèse de plusieurs analogues de ce peptide 88-99 de l'histone H4 a été réalisée en remplaçant avec succès différentes positions par leur analogue respectif N ^{α} haa, selon la méthodologie décrite ci-dessous.

A) Méthodologie de Synthèse

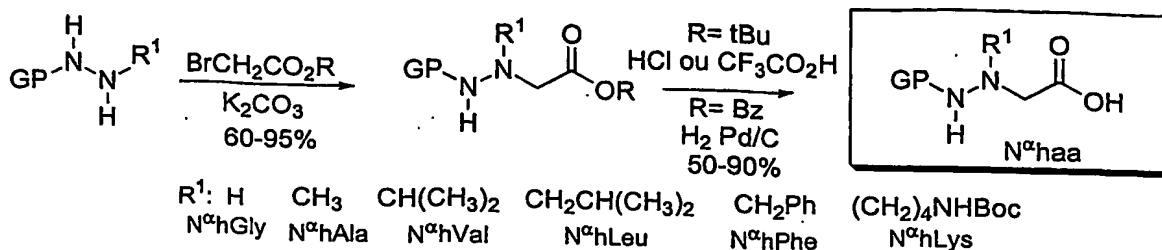
La synthèse décrite ci-après est celle d'aza- β^3 peptides ou peptides hybrides incluant un ou plusieurs monomères aza- β^3 amino acides, homologues azotés d'amino acides. Les chaînes latérales des monomères mimant les aminoacides sont portées par des atomes d'azote qui sont isoélectroniques des $\text{CH}\alpha$, (atomes d'azote chiraux à configuration non fixée), ce qui leur confère une grande liberté conformationnelle. De plus, ces monomères ne possèdent aucun centre d'asymétrie de configuration fixée. Le positionnement correct de la chaîne peptidique dans un site enzymatique se produit à la fois par le déplacement d'équilibres conformationnel et configurationnel. L'action d'un tel composé, d'un point de vue stéréochimique, est équivalente à celle d'un mélange de diastéréoisomères en équilibre rapide, l'interaction avec le site enzymatique déplaçant l'équilibre vers le plus affine.

La méthode de la présente invention permet d'introduire une grande variété de chaînes latérales, protéogéniques ou non protéogéniques, dans des positions choisies. D'autres bénéfices potentiels en résultent également tels qu'une simplification des méthodes de synthèse (suppression des problèmes stéréochimiques) et une plus grande résistance de tels analogues aux squelettes modifiés vis-à-vis de l'action des peptidases. Ceci permet d'une part de mimer la plupart des aminoacides naturels et non naturels et d'autre part d'introduire sur le squelette pseudopeptidique des chaînes latérales susceptibles de moduler ses caractéristiques biophysiques. L'introduction de groupements favorisant le passage de ces analogues à travers les membranes cellulaires (chaînes lipophiles) ou augmentant leur solubilité dans le milieu plasmatique (groupements perfluorés par exemple) nous permet de moduler, voire, d'optimiser la biodisponibilité de ces composés.

a) Monomères aza- β^3 -amino acides

Deux méthodologies de synthèse sont utilisées pour obtenir les monomères aza- β^3 -amino acides à partir des hydrazines convenablement substituées et protégées, selon la nature des chaînes latérales que l'on désire mimer.

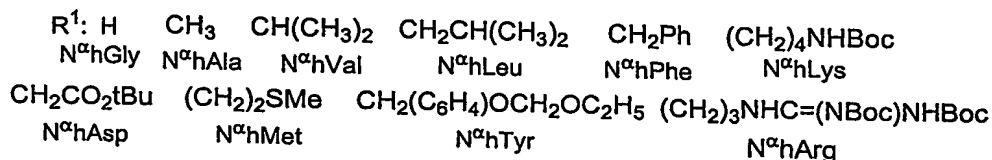
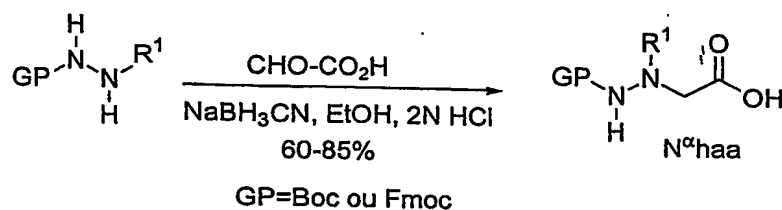
- Soit par bromoacétylation d'hydrazines N,N'-disubstituées, la déprotection du monomère orthogonalement protégé conduisant à l'aza β^3 amino acide désiré avec des rendements de l'ordre de 60-80 %.



Cette méthode consistant à réaliser une substitution nucléophile puis une déprotection a été publiée dans *Synlett* : New Monomers for Solid Phase Synthesis of Hydrazinopeptoides: the N $^\alpha$ -Substituted-N $^\beta$ -Protected hydrazinoglycines and N $^\alpha$ -Substituted-N $^\beta$ -Protected hydrazinoglycinal. A. Cheguillaume, I. Doubli-Bounoua, M. Baudy-Floc'h, P. Le Grel, *Synlett* 2000, 3, 331-334.

- Soit par amination réductrice de l'acide glyoxylique.

Cette méthode est une nouvelle méthode de synthèse des Fmoc-aza- β^3 amino acides (N $^\alpha$ haa): A une suspension d'hydrazine substituée Fmoc protégée (1eq) dans 50ml d'EtOH, de l'acide glyoxylique (1.1eq) est ajouté sous agitation. Après 0.5h, NaBH₃CN (1.2eq) est ajouté au mélange, le pH est ajusté à 3-4 par addition d'HCl 2N, après 0.5h supplémentaire le pH est ajusté à 1. Après 10 min d'agitation le mélange réactionnel est concentré par évaporation, puis dilué par addition de 100 mL d'acétate d'éthyle. La solution est lavée successivement par NaHCO₃ (5%) et de la brine puis séchée sur Na₂SO₄. Après évaporation du solvant, on obtient le monomère Fmoc-aza- β^3 amino acide avec des rendements de l'ordre de 82-87%.



a-1) Fmoc aza- β^3 -Glycine (Fmoc-N $^\alpha$ hGly-OH)

A une suspension de Fmoc carbazate (1eq) dans 50ml d'EtOH, de l'acide glyoxylique (1.1eq) est ajouté sous agitation. Après 0.5h, NaBH₃CN (1.2 eq) est ajouté

au mélange, le pH est ajusté à 3-4 par addition d'HCl 2N, après 0.5h supplémentaire le pH est ajusté à 1. Après 10 min d'agitation le mélange réactionnel est concentré par évaporation, puis dilué par addition de 100 mL d'acétate d'éthyle. La solution est lavée successivement par NaHCO₃ (5%) et de la brine puis séchée sur Na₂SO₄. Après évaporation du solvant, on obtient le monomère Fmoc-aza-β³ glycine avec un rendement de 86%.

mp: 122-124°C. ¹H NMR (DMSO) : 3.75 (s, 2H, CH₂), 4.25 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 6.90 (br s, 1H, NH), 7.30-7.85 (m, 8H, Ar), 10.0 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (DMSO): 162.90, 144.07, 141.59, 128.06, 127.38, 125.44, 120.30, 67.37, 58.00, 47.43. HRMS: (M⁺) Calc. pour C₁₇H₁₅N₂O₃ 295.1082; Tr: 295.1083.

a-2) Fmoc -aza-β³-Aspartique acide (Fmoc-N^αhAsp(OtBu)-OH).

a-2-1) Fmoc NH-NHCH₂CO₂tBu: A une solution de 2.54g de Fmoc carbazate (10 mmol) dans 10ml DMF, une solution de 1.95g de bromoacetate de tert-butyl (10mmol) dans 10ml de CH₂Cl₂ est ajoutée goutte à goutte sous agitation à température ambiante. Après 12h d'agitation, le solvant est partiellement évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (ethyl acetate / hexane 1/1) pour obtenir 2.79g (rendement: 76%) sous forme d'huile incolore qui cristallise lentement.

mp.114-116°C. ¹H NMR (CDCl₃) 1.50 (s, 9H, tBu), 3.61 (d, 2H, CH₂), 4.25 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 4.44 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 6.90 (brs, 1H, NH), 7.20-7.80 (m, 13H, ar). ¹³C NMR (CDCl₃): 171.55, 162.90, 144.07, 141.59, 128.06, 127.38, 125.44, 120.30, 82.21, 67.37, 53.10, 47.43, 28.42. C₂₁H₂₄N₂O₄ 368.1736 Calc: C, 68.45; H, 6.57; N, 7.61; Tr., C, 68.56; H, 6.73; N, 7.62.

a-2-2) Fmoc-N^αhAsp(OtBu)-OH :

Le monomère Fmoc-N^αhAsp(OtBu) est préparé en suivant le mode opératoire général d'amination réductrice à partir de l'hydrazine Fmoc NH-NHCH₂CO₂tBu décrit plus haut

87% ; mp: 98-100°C. ¹H NMR (CDCl₃): 1.50 (s, 9H, tBu), 3.60 (m, 2H, CH₂), 3.72 (m, 2H, CH₂), 4.22 (t, 1H, *J* = 6.3 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz, CH₂), 7.20 (brs, 1H, NH), 7.22-7.84 (m, 8H, ar). ¹³C NMR (CDCl₃): 171.23, 171.00, 158.03, 143.61, 141.76, 128.33, 127.59, 125.33, 120.50, 83.80, 68.19, 59.20, 58.80, 47.49,

28.53. HRMS: (M+) Calc. pour $C_{23}H_{26}N_2O_6$ 426.1790; Tr: 426.1790 Anal. calc: C, 64.76; H, 6.15; N, 6.57; Tr, C, 64.84; H, 6.18; N, 6.58.

a-3) Fmoc aza- β^3 -Methionine (Fmoc-N $^{\alpha}$ hMet-OH)

5 **a-3-1) Fmoc NH-NH(CH₂)₂SMe :** A une solution de Methyl Thio Acetaldehyde Dimethylacetal (5g, 36mmol) dans CH₂Cl₂, 16ml d'HCl (1%) est additionné. Après agitation à température ambiante pendant 0.5h, une suspension de Fmoc cabazate (8.38g, 33mmol) dans 100ml de THF est additionnée. Après 10min, 1g de tamis moléculaire (4Å) est ajouté et le mélange est laissé sous agitation pendant 12h.
10 2.14g de cyanoborohydrure de sodium (34mmol) sont ensuite ajoutés par fractions sur une période de 45min, le pH étant maintenu à 3-4 par addition par une solution d'HCl 2N. Le mélange est agité pendant 2h supplémentaire, puis ajusté à pH 1. Le mélange est dilué dans 50ml d'acétate d'éthyle, neutralisé par NaHCO₃ et lavé par de la brine. Les phases aqueuses sont extraites par 3x50ml de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont
15 rassemblées et séchées sur Na₂SO₄. Le solvant est évaporé et l'huile obtenue est reprise à l'ether de pétrole pour donner un précipité de 4.54g (42%).

mp:132°C. ¹H NMR (CDCl₃): 2.15 (s, 3H, CH₃), 2.64 (t, 2H, *J* = Hz, CH₂), 3.12 (t, 2H, *J* = Hz, CH₂), 4.25 (t, 1H, *J* = 6.6 Hz, CH), 4.52 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂), 6.46 (brs, 1H, NH), 7.25-7.82 (m, 8H, ar), 8.21 (brs, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃): 157.67,
20 144.05, 141.75, 128.21, 127.51, 125.39, 120.46, 67.41, 50.09, 47.58, 32.63, 15.66. Anal calc. pour C₁₈H₂₀O₂N₂S 328.1245: C, 65.83; H, 6.14; N, 8.54; S, 9.74. Tr: C, 65.90; H, 6.18; N, 8.62; S, 9.69.

a-3-2) Fmoc-N $^{\alpha}$ hMet-OH:

25 Le monomère Fmoc-N $^{\alpha}$ hMet-OH est préparé en suivant le mode opératoire général d'amination réductrice à partir de l'hydrazine Fmoc NH-NH(CH₂)₂SMe décrit plus haut

83%. ¹H NMR (CDCl₃): 2.15 (s, 3H, CH₃), 2.55 (t, 2H, *J* = Hz, CH₂), 3.15 (t, 2H, *J* = Hz, CH₂), 3.69 (s, 2H, CH₂), 4.20 (t, 1H, *J* = 6.6 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂), 6.95 (brs, 1H, NH), 7.25-7.82 (m, 8H, ar), 9.24 (sl, 1H, OH). ¹³C NMR (CDCl₃): 173.42, 156.02, 143.87, 141.76, 128.26, 127.54, 125.38, 120.45, 67.54, 59.18,
30 56.70, 47.56, 30.12, 16.09. HRMS [M+H]⁺ C₂₀H₂₃N₂O₄S Calc: 387.1379; Tr: 387.1379.

a-4) Fmoc aza-B³-Tyrosine (Fmoc-N^αhTyr(OCH₂OEt)-OH)

a-4-1) 4-(ethyloxymethyloxy)benzaldehyde: A un mélange de 4-hydroxybenzaldehyde (5g, 0.041 mol) et de 12ml de triéthylamine dans 30ml de THF est ajouté une solution de chlorométhyl éthyl éther (5.65g, 0.06mol) dans 20ml THF à 0°C et le mélange esst agité à température ambiante pendant 2h. Le chlorhydrate de triéthylamine est filtré et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le 4-ethyloxymethyloxy benzaldehyde sous forme d'huile (6.63g, 90%).

¹H NMR (CDCl₃): 1.30 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃), 3.70 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 5.25 (s, 2H, CH₂), 7.15-7.80 (m, 4H, ar), 10.10 (s, 1H, CHO).

a-4-2) Fmoc-NH-NHCH₂(C₆H₄)OCH₂OEt : 5.6g de Fmoc cabazate (22mmol) est ajouté sous agitation à une solution de 4-(ethyloxymethyloxy)benzaldehyde (5.3g, 29mmol) dans 100ml de THF sec à température ambiante. Après 10min, 1g de tamis moléculaire (4Å) est ajouté et le mélange est agité pendant 1h. 1.57g de cyanoborohydrure de sodium (25mmol) est ajouté en 45min et le pH est maintenu à 3-4 par addition d'une solution d'HCl (2N). Après 2h d'agitation, le pH est ajusté à 1. 50ml d'acétate d'éthyle sont alors additionnés et le mélange est neutralisé par une solution saturée de NaHCO₃. La phase aqueuse est extraite par CH₂Cl₂ (3x50ml). Les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner une huile qui par addition d'éther de pétrole donne un précipité blanc (5.34g, 58%).

Mp: 113°C. ¹H NMR (CDCl₃): 1.30 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃), 3.70 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 3.98 (d, 2H, *J* = 6.8Hz, CH₂), 4.25 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 5.25 (s, 2H, CH₂), 6.30 (brs, 1H, NH), 7.15-7.80 (m, 13H, ar), 8.21 (brs, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃): 157.49, 144.06, 141.76, 130.70, 128.19, 127.50, 125.40, 120.44, 116.68, 93.58, 67.36, 64.65, 55.48, 47.60, 15.53. Anal.Calc : C₂₅H₂₆N₂O₄: 418.1892. C, 71.74 ; H, 6.27; N, 6.70; Tr : C, 71.78; H, 6.29; N, 6.70.

a-4-3) Fmoc-N^αhTyr (OCH₂OEt)-OH :

Le monomère Fmoc-N^αhTyr (OCH₂OEt)-OH est préparé en suivant le mode opératoire général d'amination réductrice à partir de l'hydrazine Fmoc-NH-NHCH₂(C₆H₄)OCH₂OEt décrit plus haut

¹H NMR (CDCl₃): 1.25 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 3.68 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂), 3.70 (s, 2H, CH₂), 4.05 (s, 2H, CH₂), 4.20 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 5.26 (s, 2H, CH₂), 6.80 (brs, 1H, NH), 7.25-7.80 (m, 8H, ar), 8.60 (brs, 1H, NH), 9.80 (br s, 1H, OH). ¹³C NMR (CDCl₃): 173.40, 157.68, 156.02, 143.93, 141.74, 131.04, 128.23, 127.55, 125.43, 120.43, 116.73, 93.48, 66.30, 64.68, 61.11, 59.00, 47.51, 15.61. HRMS [M+H]⁺ C₂₇H₂₉N₂O₆ Calc: 477.2026; Tr: 477.2023. Anal. Calc: C, 68.04; H, 5.93; N, 5.88; Tr: C, 68.00; H, 5.90; N, 5.87.

a-5) Fmoc aza-β³ Arginine (Fmoc-N^αhArg (Boc)-OH)

a-5-1) 1-tert-Butoxycarbonylamino-3,3-diethoxypropane: Un mélange de di-tert-butyl dicarbonate (9g, 40 mmol.) dans le dioxane (40ml) est additionné goutte à goutte, à une solution, sous agitation et à 0°C, de 1-amino-3,3-diéthoxypropane (5.52g, 37 mmol) et de Et₃N (4.04g, 40 mmol) dans 5ml dioxane. Après 2h, le mélange est agité à température ambiante 12h puis le solvant est évaporé. L'huile résiduelle est reprise par 10mL d'eau, acidifiée avec 30ml HCl (1%), puis extraite à l'acétate d'éthyle (60ml x 3). Les phases organiques sont séchées (MgSO₄) et évaporées pour donner 8.89 g de 1-tert-Butoxycarbonyl-amino-3,3-diethoxypropane (90%).

¹H NMR (CDCl₃): 1.20 (t, 6H, *J* = 8.8 Hz, CH₃), 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.60-2.00 (m, 2H, CH₂C), 3.00-3.80 (m, 6H, OCH₂+NHCH₂), 4.50 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz, CH), 5.05-5.10 (br, 1H, NH).

a-5-2) 3-tert-Butoxycarbonylaminopropanal: Une solution de 1-tert-Butoxycarbonyl-amino-3,3-diethoxypropane (8.89g, 36mmol) dans 15ml d'acide acétique et 4ml d'eau est agitée à température ambiante pendant 10h, puis neutralisée par NaHCO₃, reprise à l'acétate d'éthyle et lavée à brine. Les phases organiques sont évaporées à pression réduite pour donner 5.17g de 3-tert-butoxycarbonylaminopropanal (83%).

¹H NMR (CDCl₃): 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.60-2.80 (t, 2H, CCH₂), 3.20-3.50 (m, 2H, NCH₂), 5.10-5.20 (br s, 1H, NH), 9.86 (s, 1H, CHO).

a-5-3) Fmoc-NH-NH(CH₂)₃ NHBoc: 5.08g de Fmoc carbazate (20mmol) est additionné à une solution sous agitation de 3-tert-Butoxycarbonylaminopropanal (3.46g, 20mmol) dans 100ml de THF sec à température ambiante. Après 10min, 1g de tamis moléculaire (4Å) est ajouté et le mélange

réactionnel est agité pendant 12h. 1.26g de cyanoborohydrure de sodium (20mmol) est ajouté par fractions en 45min. Le pH est maintenu à 3-4 par addition d'une solution d'HCl 2N. Le mélange est agité pendant 2h supplémentaire, puis le pH est ajusté à 1. 50 mL d'acétate d'éthyle sont alors ajouté au mélange, la solution est neutralisée par NaHCO₃. Le mélange est extrait par CH₂Cl₂ (3x50ml). Les phases organiques sont séchées (Na₂SO₄) et le solvant est évaporé pour donner une huile qui cristallise par addition d'éther de pétrole (4.27g, 52%).

mp: 101°C. ¹H NMR (DMSO) 1.40 (s, 9H, tBu), 1.50 (m, 2H, CH₂), 2.68 (m, 2H, CH₂), 2.98 (m, 2H, CH₂), 4.24 (t, 1H, J = 6.9 Hz, CH), 4.32 (d, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂), 4.70-4.85 (brs, 1H, NH), 6.78 (brs, 1H, NH), 6.80 (brs, 1H, NH), 7.25-7.90 (m, 8H, ar). ¹³C NMR (DMSO) 157.21, 155.95, 144.18, 142.94, 127.98, 127.64, 125.59, 120.46, 77.71, 65.82, 47.08, 38.39, 28.62, 28.21. HRMS calc C₂₃H₂₉N₃O₄: 411.2158 Anal Calc C₂₃H₂₉N₃O₄: C, 67.12; H, 7.11; N, 10.22. Tr: C, 67.22; H, 7.19; N, 10.24.

a-5-4) Aza-β³-(Boc)homolysinate de benzyle

A une solution d'hydrazine Fmoc protégée Fmoc-NH-NH(CH₂)₃ NHBoc obtenue lors de l'étape précédente (3.7g, 9mmol) et de 2-bromoacetate de benzyle (2.66g, 11.6mmol) dans 20ml de toluène est ajoutée K₂CO₃ (802mg, 5.8mmol). Le mélange est porté à reflux sous agitation pendant 28h. La solution est filtrée et évaporée sous vide. Le brut est chromatographié sur gel de silice (ethyl acetate/hexane 1/3) pour donner 3.02g (60%) d'aza-β³-(Boc)homolysinate de benzyle sous forme d'huile qui précipite lentement.

mp: 107°C. ¹H NMR (CDCl₃) 1.50 (s, 9H, tBu), 1.62 (m, 2H, CH₂), 2.97 (m, 2H, CH₂), 3.24 (m, 2H, CH₂), 3.75 (m, 2H, CH₂), 4.20 (t, 1H, J = 6.9 Hz, CH), 4.50 (d, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂), 5.19 (s, 2H, CH₂), 6.88 (brs, 1H, NH), 7.25-7.90 (m, 13H, Ar). ¹³C NMR (CDCl₃): 171.23, 156.55, 155.50, 144.13, 141.77, 135.54, 129.13, 129.04, 128.84, 128.14, 127.47, 125.44, 120.40, 79.38, 67.09, 64.47, 57.63, 54.56, 47.67, 38.83, 28.85, 27.83. HRMS calc. : C₃₂H₃₇N₃O₆: 559.2682. Anal calc. C₃₂H₃₇N₃O₆: C, 68.66 ; H, 6.67; N, 7.51. Tr: C, 68.59; H, 6.86; N, 7.28.

a-5-5) Aza-β³-homolysinate de benzyle

A une solution de d'aza-β³-(Boc)homolysinate de benzyle (0.56g, 1mmol) dans 4 mL de DCM, 2 mL de TFA sont ajoutés et la solution est agitée pendant 6h à température ambiante. Une évaporation sous pression réduite conduit à l'aza-β³-homolysinate de benzyle (0.41g, 92%) sous forme d'huile.

a-5-6) Aza- β^3 -arginate (N-Boc) de benzyle

L'aza- β^3 -homolysinate de benzyle (0.18g, 0.40mmol) en solution dans 5ml de CH_2Cl_2 est lentement additionné à une solution de $(\text{BocNH})_2\text{C}=\text{NTf}$ (0.16g, 0.41mmol) [(BocHN) $_2$ C=NTf est préparé selon la méthodologie de Feichtinger, K; Zapf, C; Sings, H.L; Goodman, M. *J.Org.Chem.* 1998, 63, 3804] et de triéthylamine (0.64ml, 0.46mmol). Après agitation à température ambiante pendant 12h, la solution est lavée par une solution saturée de NaHCO_3 (25ml) et la phase aqueuse est extraite par CH_2Cl_2 (3x50ml). Les phases organiques réunies sont séchées sur Na_2SO_4 et concentrées in vacuo. Le brut, purifié par flash chromatographie (ethyl acetate/hexane 1/2), conduit à l'aza- β^3 -arginate (N-Boc) de benzyle 0.23g (85%).

mp: 70-72°C. ^1H NMR (CDCl_3) 1.39 (s, 18H, tBu), 1.60 (m, 2H, CH_2), 2.80 (m, 2H, CH_2), 3.32 (m, 2H, CH_2), 3.66 (m, 2H, CH_2), 4.24 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz, CH), 4.45 (d, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH_2), 5.05 (s, 2H, CH_2), 6.95 (brs, 1H, NH), 7.27-7.82 (m, 13H, Ar), 8.28 (brs, 1H, NH), 11.45 (brs, 1H, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.45, 170.80, 163.97, 156.57, 153.59, 144.17, 141.73, 135.67, 129.06, 128.91, 128.78, 128.09, 127.45, 125.47, 120.34, 83.35, 79.48, 66.93, 60.74, 58.04, 53.89, 47.64, 38.83, 28.67, 28.44, 27.45. HRMS $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_8$ Calcd. 701.3424 Anal. Calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_8$ C, 65.02; H, 6.75; N, 9.98. Found: C, 65.10; H, 6.83; N, 9.98.

a-5-7) FmocN $^{\alpha}$ hArg(Boc)-OH :

30mg de Pd/C à 10% sont ajoutés à une solution d'aza- β^3 -arginate (N-Boc) de benzyle (0.35g, 0.5mmol) dans 25ml d'éthanol sous atmosphère d'hydrogène. Le mélange est agité à température ambiante pendant 6h. Le catalyseur est filtré sur celite. La celite est lavé par EtOH (3x15ml) et le filtrat est évaporé pour conduire à 0.26g (89%) d'aza- β^3 -arginine (N-Boc) sous forme d'huile qui cristallise lentement.

Mp: 94°C. ^1H NMR (CDCl_3) 1.38 (s, 9H, tBu), 1.39 (s, 9H, tBu), 1.62 (m, 2H, CH_2), 2.89 (m, 2H, CH_2), 3.38 (m, 2H, CH_2), 3.60 (m, 2H, CH_2), 4.14 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz, CH), 4.40 (d, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH_2), 7.27-7.82 (m, 8H, Ar), 7.95 (br s, 1H, NH), 8.50 (br s, 1H, NH), 11.50 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3): 171.35, 170.70, 163.90, 157.45, 153.57, 143.96, 141.75, 128.18, 127.52, 127.31, 125.44, 120.38, 83.35, 79.60, 67.42, 58.04, 53.89, 47.61, 38.83, 28.59, 28.46, 27.47. HRMS calc pour $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_8$ (M+) 611.2955. Tr (M+) 611.2958. Anal. Calc. for $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_8$: C, 60.85; H, 6.76; N, 11.45. Tr. C, 60.95; H, 6.78; N, 11.47.

a-6) Fmoc aza- β^3 -Lysine (Fmoc-N^αhLys-OH)

a-6-1) 1-*tert*-Butoxycarbonylamino-3,3-diethoxybutane: Un mélange de di-*tert*-butyl dicarbonate (9.6 g, 40 mmol.) dans le dioxane (40ml) est additionné goutte à goutte, à une solution, sous agitation et à 0°C, de 1-amino-3,3-diéthoxybutane (5.9, 37 mmol) et de Et₃N (4.04g, 40 mmol) dans 5ml dioxane. Après 2h, le mélange est agité à température ambiante 12h puis le solvant est évaporé. L'huile résiduelle est reprise par 10mL d'eau, acidifiée avec 30ml HCl (1%), puis extraite à l'acétate d'éthyle (60ml x 3). Les phases organiques sont séchées (MgSO₄) et évaporées pour donner 9.4 g de 1-*tert*-Butoxycarbonyl-amino-3,3-diethoxybutane (90%).

¹H NMR (CDCl₃): 1.20 (t, 6H, *J* = 8.8 Hz, CH₃), 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.60-1.80 (m, 2H, CH₂C), 3.15 (m, 2H NCH₂), 3.48 (m, 2H, OCH₂), 3.85 (m, 2H, OCH₂), 4.45 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz, CH), 4.65-4.70 (br, 1H, NH).

a-6-2) 3-*tert*-Butoxycarbonylaminobutanal: Une solution de 1-*tert*-Butoxycarbonyl-amino-3,3-diethoxybutane (1.61g, 6.2 mmol) dans 12ml d'acide acétique et 6ml d'eau est agitée à température ambiante pendant 5h, puis neutralisée par NaHCO₃, reprise à l'acétate d'éthyle et lavée à brine. Les phases organiques sont évaporées à pression réduite pour donner 1.27g d'une huile correspondant au 3-*tert*-butoxy carbonylaminobutanal en équilibre avec l'hydroxy-2 pyrazolidine.

¹H NMR (CDCl₃): 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.70-2.00 (m, 4H, CH₂), 3.20-3.50 (m, 2H, CH₂), 5.30-5.40 (br s, 1H, NH), 9.86 (s, CHO).

a-6-3) Fmoc-NH-NH(CH₂)₄NHBoc: 5.08g de Fmoc carbazate (20mmol) est additionné à une solution sous agitation de 3-*tert*-Butoxycarbonylaminobutanal (3.46g, 20mmol) dans 100ml de THF sec à température ambiante. Après 10min, 1g de tamis moléculaire (4Å) est ajouté et le mélange réactionnel est agité pendant 12h. 1.26g de cyanoborohydrure de sodium (20mmol) est ajouté par fractions en 45min. Le pH est maintenu à 3-4 par addition d'une solution d'HCl 2N. Le mélange est agité pendant 2h supplémentaire, puis le pH est ajusté à 1. 50 mL d'acétate d'éthyle sont alors ajoutés au mélange, la solution est neutralisée par NaHCO₃. Le mélange est extrait par CH₂Cl₂ (3x50ml). Les phases organiques sont séchées (Na₂SO₄) et le solvant est évaporé pour donner une huile qui cristallise par addition d'éther de pétrole (4.27g, 52%).

84%. mp: 149°C ^1H NMR (DMSO): 1.45 (s, 9H, tBu), 1.55 (m, 4H, 2CH₂), 2.90 (m, 2H, CH₂), 3.20 (m, 2H, CH₂), 4.25 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz, CH), 4.50 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 4.65 (br s, 1H, NH), 6.45 (br s, 1H, NH), 7.30-7.85 (m, 8H, ar). ^{13}C NMR (DMSO): 158.53, 156.06, 144.13, 141.07, 128.00, 127.41, 125.55, 120.44, 77.73, 65.82, 50.05, 47.05, 40.52, 28.58, 27.47, 24.93. Anal. Calc : C₂₄H₃₁N₃O₄ 425.2314 C, 67.73; H, 7.35; N, 9.88; Tr: C, 67.70; H, 7.33; N, 9.87.

a-6-4) Fmoc-N α hLys (Boc)-OH:

Le monomère Fmoc-N α hLys(Boc)-OH est préparé en suivant le mode opératoire général d'amination réductrice à partir de l'hydrazine Fmoc-NH-NH(CH₂)₄NHBoc décrit plus haut

82%. ^1H NMR (CDCl₃): 1.45 (s, 9H, tBu), 1.55 (m, 4H, 2 CH₂), 3.10 (m, 2H, CH₂), 3.60 (m, 2H, CH₂), 4.25 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz, CH), 4.50 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 4.80 (br s, 1H, NH), 6.90 (br s, 1H, NH), 7.30-7.85 (m, 8H, ar). ^{13}C NMR (CDCl₃): 170.97, 156.49, 156.00, 144.17, 141.76, 128.84, 128.14, 125.48, 120.40, 79.38, 67.04, 58.00, 56.52, 47.64, 40.53, 28.83, 27.68, 25.01. HRMS C₂₆H₃₃N₃O₆ [M+Na]⁺ Calc: 506.2267; Tr: 506.2265.

a-7) Fmoc -aza- β^3 -Asparagine (Fmoc-N α hAsn(Trt)-OH).

a-7-1) Boc NH-NHCH₂CONH₂: A une solution de glyoxalate de méthyle (3 g ; 33,6mmol) dans le DCM (50mL) est ajouté du Boc carbazate (4,23g ; 0,95 eq). Le milieu réactionnel est laissé 12h sous agitation à température ambiante et est concentré pour donner un solide pâteux directement réduit par hydrogénation catalytique dans le méthanol (30mL) en présence de Pd/C (200mg) pendant 20h. Le milieu réactionnel est concentré puis une solution de méthanol ammoniacal 6N (13mL) est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 48h à température ambiante puis est concentré. En présence d'éther diéthylique l'huile précipite pour donner le produit attendu sous forme d'un solide blanc (4,27g, 70%).

RMN ^1H (CDCl₃) δ ppm: 1,49 (s, 9H, CH₃) ; 3,56 (s, 2H, CH₂) ; 5,88 (brs, 1H, NH) ; 6,43 (s, 1H, NH amide) ; 7,33 (s, 1H, NH amide).

a-7-2) Boc-Aza- β^3 -Asn-OBn : A une solution d'amide (7,1g ; 37mmol) dans un mélange 1/1 toluène/DMF (70mL) est ajouté successivement le K₂CO₃ (4,6g ; 0,7eq) et le bromoacétate de benzyle (17,10g ; 2eq). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 50°C pendant 5 jours puis il est concentré et repris avec

100mL de DCM. Après deux lavages à l'eau (2x50mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis est concentrée pour donner une pâte. La trituration dans l'éther diéthylique permet d'obtenir une poudre blanche (5,35g ; 42%) correspondant au produit attendu.

5 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm: 1,45 (s, 9H, CH₃) ; 3,61 (s, 2H, CH₂) ; 3,77 (s, 2H, CH₂) ; 5,21 (s, 2H, CH₂) ; 5,50 (brs, 1H, NH) ; 6,94 (s, 1H, NH amide) ; 7,33-7,45 (m, 5H, Ar) ; 8,18 (s, 1H, NH amide).

10 RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm: 28,2 (CH₃) ; 58,58 (CH₂N) ; 60,89 (CH₂N) ; 67,03 (CO₂CH₂) ; 81,23 (C(CH₃)) ; 128,47 128,71 128,75 134,92 (C Ar) ; 155,75 (Boc CO) ; 170,32 (CO₂Bn) ; 172,68 (CONH₂).

a-7-3) Fmoc-Aza-β³-Asn-OBn : On fait buller du HCl gazeux dans une solution de BocAza-β³-AsnOBn (6,40g) dans 100mL de DCM. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1 nuit à température ambiante puis est concentré. Le solide blanc obtenu est trituré dans l'éther puis est filtré. Il est mis en présence de triéthylamine (2,30g ; 1,2eq) dans le DCM (60mL). La solution limpide est concentrée pour donner un solide pâteux directement solubilisé dans un mélange eau/THF 1/1 (100mL). NaHCO₃ (3,19g ; 2eq) est ajouté ainsi qu'une solution de FmocCl (5,88g ; 1,2eq) dans le THF (50mL) goutte à goutte. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24h à température ambiante. Après ajout d'éther diéthylique (75mL) la phase organique est récupérée et est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis est concentrée pour donner une huile marron. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/AcOEt 3/7 et 1/9) pour récupérer le produit attendu sous la forme d'une poudre blanche (g ; %).

25 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm: 3,62 (s, 2H, CH₂) ; 3,76 (s, 2H, CH₂) ; 4,21 (t, 1H, CH Fmoc) ; 4,47 (d, 2H, CH₂ Fmoc) ; 5,23 (s, 2H, CH₂) ; 5,42 (brs, 1H, NH) ; 7,16 (s, 1H, NH amide) ; 7,28-7,56 (m, 9H, Ar) ; 7,56 (d, 2H, Ar) ; 7,78 (d, 2H, Ar) ; 7,94 (s, 1H, NH amide).

30 RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm: 49,24 (CH Fmoc) ; 60,51 (CH₂N) ; 62,80 (CH₂N) ; 69,19 (CH₂ Fmoc) ; 69,37 (CO₂CH₂) ; 122,17 127,09 129,24 129,96 130,54 130,63 130,66 130,71 137,00 143,44 145,58 (C Ar) ; 158,56 (Fmoc CO) ; 172,29 (CO₂Bn) ; 174,32 (CONH₂).

a-7-4) **Fmoc-Aza- β^3 -Asn(NHTrt)-OBn** : A une solution de Fmoc-Aza- β^3 -Asn(NHTrt)-OBn (180mg, 0,4mmol) dans 2mL d'AcOH sont ajoutés successivement le triphénylméthanol (102mg, 1eq), l'anhydride acétique (80mg, 2eq) et 2 μ L d' H_2SO_4 concentré. Le milieu réactionnel, sous agitation, est porté à 55°C pendant 1 heure puis est laissé refroidir à température ambiante. Le milieu réactionnel est concentré à son 1/3 pour ajouté 10mL d'eau glacial. Après extraction à l'AcOEt, la phase organique est lavée à l'eau et avec une solution aqueuse saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 puis est concentrée. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/EP) pour récupérer 140mg (50%) de produit attendu sous la forme d'un solide blanc.

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm: 3,70 (s, 2H, CH_2) ; 3,82 (s, 2H, CH_2) ; 4,12 (t, 1H, CH Fmoc) ; 4,26 (d, 2H, CH_2 Fmoc) ; 5,24 (s, 2H, CH_2) ; 7,28-7,60 (m, 26H, Ar); 7,81 (d, 2H, Ar) ; 9,47 (s, 1H, NH).

a-8) Fmoc -aza- β^3 -Proline (Fmoc-N $^{\alpha}$ hPro-OH).

a-8-1) **ZNH-NHBoc**: A une solution de Boc carbazate (7.93g, 60mmol) dans 60mL de CHCl_3 est ajoutée une solution aqueuse de NaOH (2.4g, 1eq dans 60mL d'eau). Le mélange est refroidi dans un bain de glace et une solution de benzylchloroformate (10.24g 1eq) dans CHCl_3 (60mL) est additionnée lentement , puis le mélange est maintenu à température ambiante sous agitation pendant 12h. La phase organique est ensuite lavée à l'eau, à la brine puis séchée sur Na_2SO_4 . Après évaporation du solvant le solide blanc obtenu est repris à l'éther de pétrole et filtré (14.17g, 89%).

a-8-2) **Benzyl-pyrazolidine-1-carboxylate**: A une solution d'hydrazine bis protégée (5.33g, 20mmol) dans le DMF (40mL), NaH (80% in oil, 1.21g, 2.1eq) est ajouté à 0°C. Après agitation du milieu réactionnel pendant 30 min à temperature ambiante, le 1,3-dibromopropane (4.04g, 1eq) est ajouté et le mélange est agité pendant 12h. Le mélange est verse dans l'eau (80mL) et extrait deux fois avec AcOEt (2x75mL). La phase organique est lavée à l'eau, à la brine et séchée sur Na_2SO_4 . Après évaporation du solvant, le mélange est purifié sur colonne par chromatographie sur gel de silice (PE-AcOEt 75-25) et conduit à 5.00g de benzyl *tert*-butyl pyrazolidine-1,2-dicarboxylate (82%), qui est ensuite déprotégé par dissolution (5.00g, 16.3mmol) dans 50mL DCM et saturation en HClg. Après 12h d'agitation à température ambiante, le milieu est concentré et repris par 30mL d'eau. AcOEt (70mL) est ajouté et la solution

est neutralisée par addition d'une solution saturée de NaHCO_3 . La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 , et concentrée pour donner une huile incolore (3.30g, 98%).

5 **a-8-3) Z -Aza- β^3 -Proline *tert*-butyl ester:** A une solution de benzyl-pyrazolidine-1-carboxylate (3.30g, 16mmol) dans le toluène (40mL) est ajouté K_2CO_3 (1.55g, 0.7eq) et du bromoacetate *de tert*-butyl (4.68g, 1.5eq). Le mélange est agité pendant 4 jours à 75°C puis filter. Le filtrat est ensuite lave à l'eau, à la brine, puis séché sur Na_2SO_4 . Après évaporation du solvant, l'huile obtenue est purifiée sur une
10 colonne de chromatographie de gel de silice (PE-AcOEt 70-30) pour donner 4.35g de Z -Aza- β^3 -Proline *tert*-butyl ester sous forme d'huile (85%).

^1H NMR (CDCl_3): 1.49 (s, 9H, CH_3), 2.16 (q, 2H, CH_2), 3.24 (t, 2H, CH_2), 3.51 (s, 2H, CH_2), 3.65 (t, 2H, CH_2), 5.22 (s, 2H, CH_2), 7.30-7.49 (m, 5H, Ar).

^{13}C NMR (CDCl_3) : 26.11 $\underline{\text{CH}_2}$, 29.74 $\underline{\text{CH}_3}$, 47.09 54.97 60.22 N- $\underline{\text{CH}_2}$, 68.85 $\underline{\text{CH}_2}$,
15 83.06 $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$, 127.83 127.89 128.40 138.37 $\underline{\text{C}}_{\text{ar}}$, 157.05 $\underline{\text{COCH}_2}$, 170.39 $\underline{\text{CO}}$.

20 **a-8-4) Aza- β^3 -Proline *tert*-butyl ester :** 10% Pd/C (80mg) est ajouté à une solution de Z -Aza- β^3 -Proline *tert*-butyl ester (1.00g, 3.12mmol) dans MeOH (10mL). Le mélange est laissé sous agitation et sous atmosphère d'hydrogène pendant 12h (évolution contrôlé par TLC). Le catalyseur est filtré sur célite et le filtrat est évaporé , on obtient 0.58g (99%) d'Aza- β^3 -Proline *tert*-butyl ester sous forme d'huile.

^1H NMR (CDCl_3): 1.50 (s, 9H, CH_3), 2.01 (q, 2H, CH_2), 2.90 (t, 2H, CH_2), 3.03 (t, 2H, CH_2), 3.39 (brs, 1H, NH), 3.51 (s, 2H, CH_2).

25 **a-8-5) Fmoc-Aza- β^3 -Proline *tert*-butyl ester:** A une solution d'Aza- β^3 -Proline *tert*-butyl ester (0.58g, 3.12mmol) dans THF/eau (10 / 5 mL), sous agitation est ajouté NaHCO_3 (0.52g, 2eq) puis goutte à goutte, une solution de FmocCl (0.97g, 1.2eq) dans le THF (10mL). Après agitation pendant 12h à température ambiante
30 de l' éther (50mL) est ajouté et la phase organique est prélevée, lavée à la brine, séchée sur Na_2SO_4 , puis évaporée. L'huile obtenue est purifiée sur colonne de chromatographie

de gel de silice (EP/EtOAc 9/1 and 6/4). On obtient 1.00g (79%) de Fmoc-Aza- β^3 -Proline *tert*-butyl ester sous forme d'huile.

^1H NMR (CDCl_3): 1.52 (s, 9H, CH_3), 2.18 (q, 2H, CH_2), 3.27 (t, 2H, CH_2), 3.55 (s, 2H, CH_2), 3.65 (t, 2H, CH_2), 4.33 (t, 1H, CH Fmoc), 4.46 (d, 2H, CH_2 Fmoc), 7.30-7.88 (m, 8H, Ar).

a-8-6) Fmoc-Aza- β^3 -Proline : Une solution de Fmoc-Aza- β^3 -Proline *tert*-butyl ester (1.00g, 2.5mmol) dans 10mL de DCM est saturée en HClg puis agitée à température ambiante pendant 5h. Le solvant est évaporé, le mélange est repris par de l'eau (20mL), puis l'on ajoute une solution NaHCO_3 (N) jusqu'à pH basique. La phase aqueuse est extraite à l'éther, acidifiée par HCl 2N, puis extraite à l'AcOEt. La phase organique est lavée à la brine séchée sur Na_2SO_4 . Après évaporation du solvant le solide obtenu est trituré dans l'éther de pétrole, on obtient la Fmoc-Aza- β^3 -Proline (0.64g, 74%) sous la forme d'un solide blanc. Mp : 130°C

^1H NMR (CDCl_3) : 2.01 (q, 2H, CH_2), 2.89 (t, 2H, CH_2), 3.34 (s, 2H, CH_2), 3.35 (t, 2H, CH_2), 4.15 (t, 1H, CH Fmoc), 4.47 (d, 2H, CH_2 Fmoc), 7.30-7.88 (m, 8H, Ar).

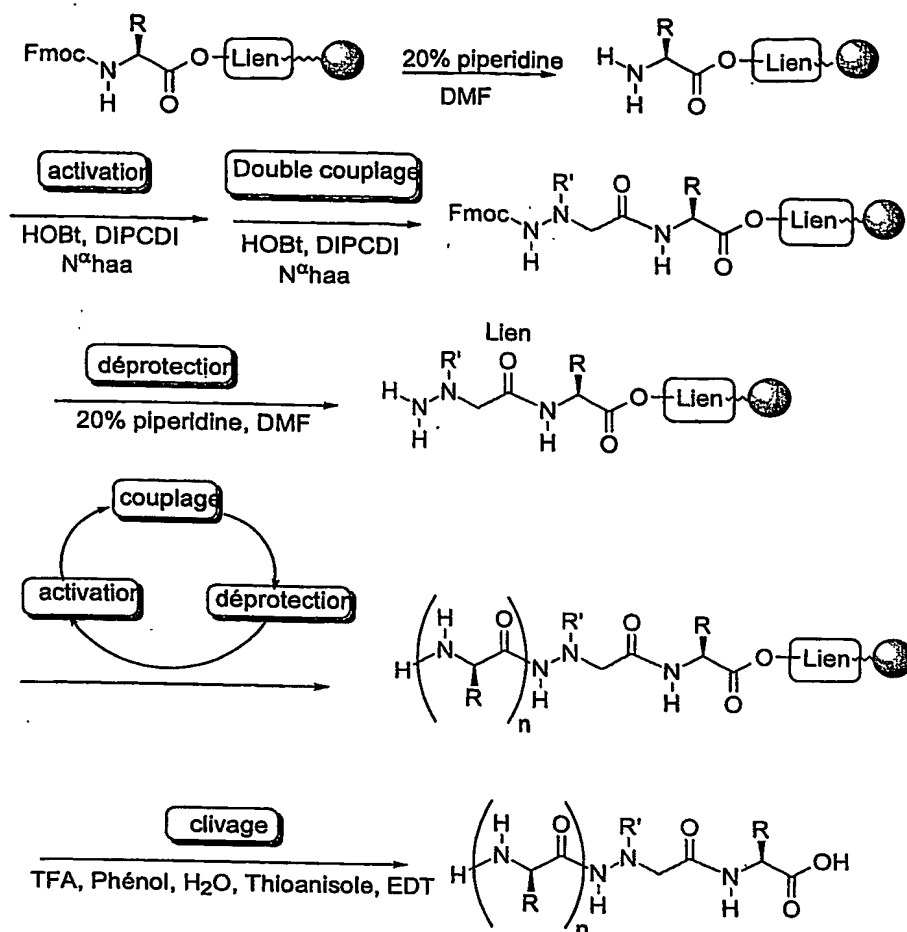
^{13}C NMR (CDCl_3) : 24.10 $\underline{\text{CH}_2}$, 43.47 N- $\underline{\text{CH}_2}$, 45.94 $\underline{\text{CH}}$ Fmoc, 54.12 59.98 N- $\underline{\text{CH}_2}$, 67.08 $\underline{\text{CH}_2}$ Fmoc, 118.80, 123.63, 125.95, 126.67, 140.13, 142.12 $\underline{\text{Car}}$, 157.15 $\underline{\text{CO}}$ Fmoc, 169.70 $\underline{\text{COOH}}$.

HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+ \text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ calc : 375.13208 ; tr. 375.1320.

b) Synthèse peptidique : Peptides Hybrides

Les monomères décrits ci-dessus peuvent, à l'instar d'un amino acide protégé, être intégrés dans des positions choisies d'un peptide par synthèse sur support solide à l'aide d'un automate de synthèse à stratégie Fmoc afin d'obtenir des peptides hybrides. Ils peuvent également être associés pour conduire à des oligomères constitués exclusivement d'unités aza- β^3 -amino acides.

La synthèse des peptides hybrides a été effectuée selon le schéma suivant :



La synthèse des analogues peptidiques a été réalisée à l'aide d'un synthétiseur automatique modèle PepSynthesizer™ 9050, Milligen, fonctionnant en stratégie Fmoc en condition de flux continu. Les groupements fonctionnels des chaînes latérales des Fmoc-aminoacides sont protégés par les groupements protecteurs suivants: un groupement *t*-butoxycarbonyle (Boc) pour la Lysine (Lys), *t*-Butyl (tBu) pour la Tyrosine (Tyr) et la Thréonine (Thr), triphénylméthyle (Trt) pour la Glutamine (Gln) et 2,2,4,5,6,-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyle (Pbf) pour l'Arginine (Arg). Le DMF ne doit contenir aucune amine susceptible de déprotéger le groupement Fmoc au cours de la synthèse et la pipéridine utilisée pour les étapes de déprotection est pure à 99%. Le diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) et le 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) sont utilisés en tant qu'agents de couplage.

La résine (1.00 g) préchargée (à ~ 0.2 mmol/g) par un résidu amino acide ou aza- β^3 -aminoacide est placée dans le réacteur du synthétiseur. Les couplages sont réalisés avec quatre fois la stoechiométrie en amino acide ou en aza- β^3 -aminoacide et un temps de couplage de 30 mn, et selon les amino acides ou les aza- β^3 -aminoacides utilisés, un

double couplage ou un temps de couplage de 60 mn est nécessaire. Après chaque étape de couplage et en fin de synthèse, l'extrémité N-terminale du dernier résidu greffé est déprotégée automatiquement par une solution à 20% de pipéridine dans le DMF.

Le clivage de la résine et la déprotection des groupements fonctionnels des chaînes latérales sont réalisés simultanément par action du réactif K (82.5 % TFA, 5 % phénol, 5 % eau, 5 % thioanisole et 2.5 % éthanedithiole). La résine est extraite du réacteur et rincée au dichlorométhane, puis séchée au dessiccateur. Elle est placée dans un ballon puis le cocktail de clivage K fraîchement préparé est ajouté et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 3 h à température ambiante. La solution contenant le peptide hybride est ensuite récupérée par filtration de la résine sur fritté. Après évaporation du solvant sous pression réduite jusqu'à un volume d'environ 2 mL, le peptide hybride brut est isolé par précipitation dans l'éther glacé et filtration sur fritté. Il est purifié par HPLC sur une colonne phase inverse C18 (250 x 4.6 mm) selon un gradient d'élution (solvant A : eau + TFA 0.1 % et solvant B acétonitrile + TFA 0.08 %) 0% B à 70% B en 20min puis 70% B à 0% B en 5 min, avec un débit de 1.2 mL / min. La détection UV est réalisée à 210 nm. La pureté des peptides hybrides synthétisés est contrôlée en spectrométrie de masse par la technique ESI dans un mélange acétonitrile / eau (50 / 50).

88-99 H4

La synthèse d'analogues du peptide 88-99 de l'histone H4, pour lequel nous avons remplacé avec succès différentes positions, a été réalisée selon cette méthodologie. Pour exemple les monomères Ala, Leu, Lys, Tyr, Gly ont été remplacés par leur analogue respectif N^α-hAla, N^α-hLeu, N^α-hLys, N^α-hTyr, N^α-hGly etc

Peptide 88-99 de l'histone H4:

H-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-OH

Exemples de peptides hybrides préparés:

- SEQ ID NO : 2 (ou peptide E):

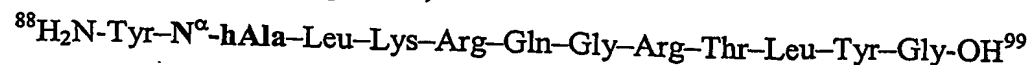
⁸⁸H₂N-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-N^α-hLeu-Tyr-Gly-OH⁹⁹

[M+H]⁺ = 1440.8 ([M+H]⁺ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé [M+2H]⁺⁺ = 720.9.

- SEQ ID NO : 3 (ou peptide C):

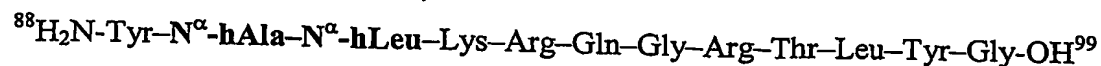
⁸⁸H₂N-Tyr-Ala-N^α-hLeu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-OH⁹⁹

$[M+H]^+ = 1440.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 720.9$.
- SEQ ID NO : 4 (ou peptide A):



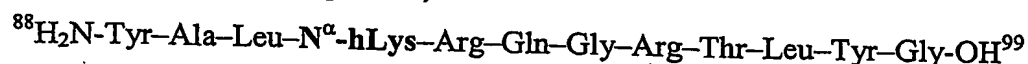
$[M+H]^+ = 1440.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 720.9$.

5 - SEQ ID NO : 5 (ou peptide B):



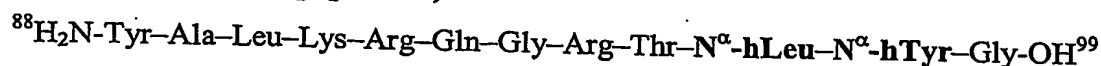
$[M+H]^+ = 1455.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 728.4$.

- SEQ ID NO : 6 (ou peptide D):



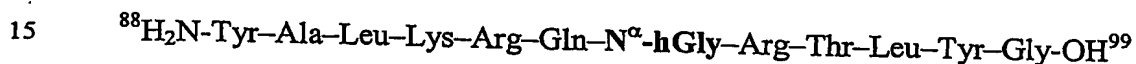
10 $[M+H]^+ = 1440.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 720.9$.

- SEQ ID NO : 7 (ou peptide G) :



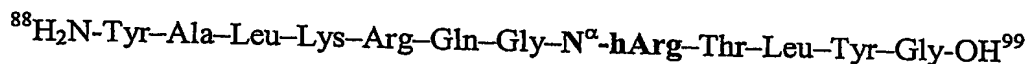
$[M+H]^+ = 1455.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 728.4$.

- SEQ ID NO : 8 :



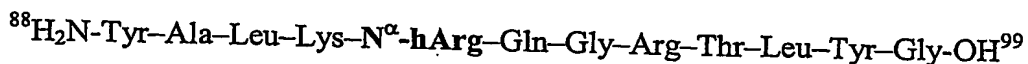
$[M+H]^+ = 1440.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 720.9$.

- SEQ ID NO : 9 :



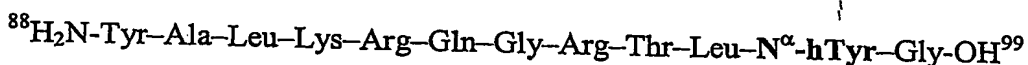
$[M+H]^+ = 1440.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 720.9$.

20 - SEQ ID NO : 10 :



$[M+H]^+ = 1440.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 720.9$.

- SEQ ID NO : 11 :



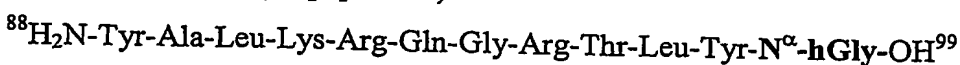
25 $[M+H]^+ = 1440.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 720$.

- SEQ ID NO : 12 (ou peptide F):



$[M+H]^+ = 1440.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 720.9$.

30 - SEQ ID NO : 13 (ou peptide H):



$[M+H]^+ = 1440.8$ ($[M+H]^+$ théorique = 1440.8) et pic de l'ion dichargé $[M+2H]^{++} = 720.9$.

- SEQ ID NO : 14 (ou peptide I):

$^{88}\text{H}_2\text{N-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-N}^\alpha\text{-hLeu-N}^\alpha\text{-hTyr-N}^\alpha\text{-hGly-OH}^{99}$

$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1470.8$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ théorique = 1470.8) et pic de l'ion dichargé $[\text{M}+2\text{H}]^{++} = 735.9$.

5 **B) Analyses biologiques**

Les souris BALB/c ont été immunisées avec le peptide parent 88-99 H4 et dans les cultures les lymphocytes T de ces souris ont été restimulés avec le même peptide ou avec les analogues A-E. La prolifération cellulaire a été mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée et l'indice de stimulation (IS) par rapport aux puits sans peptide a été
10 calculé. Les tests sont réalisés en triplicat et l'expérience est réalisée plusieurs fois dans des expériences indépendantes. Les premiers résultats (voir figure 1) montrent qu'un des peptides modifiés, à savoir l'analogue E (IS de 7.7 à 90 μM) a une activité analogue, voir supérieure selon les expériences, à celle du peptide parent (IS de 6.7 à 90 μM).

15

Par ailleurs une manip miroir de la précédente a été réalisée, à savoir des tests de réponse sur les lymphocytes T de souris injectées avec les peptides modifiés et stimulation ex vivo avec le peptide parent (88-99). Après injection des analogues, des analyses ont été réalisées sur des cultures de cellules avec lesdits analogues et le peptide
20 parent 88-99. On observe les résultats suivants :

1) les peptides A et D sont immunogènes (induisent des réponses contre le peptide homologue) mais sans réaction croisée avec le peptide parent (voir figure 2).

25 2) le peptide E est immunogène et les cellules T générées réagissent par réaction croisée avec le peptide parent (voir figure 3).

Le peptide E croise parfaitement avec le peptide parent 88-99.

Les mêmes expériences ont été effectuées avec le peptide G, (correspondant à la
30 séquence SEQ ID NO : 7).

Les résultats (voir Figure 4) montrent que l'analogue G (IS de 16,6 à 100 μM) a une activité analogue à celle du peptide parent (IS de 16,9 à 100 μM).

Par ailleurs, une expérience miroir de la précédente a été réalisée, à savoir expérience sur des souris injectées avec le peptide G et stimulation *ex vivo* avec des quantités croissantes du peptide parent (88-99). On observe que le peptide G est immunogène et que les cellules T générées contre ce peptide réagissent par réaction
 5 croisée avec le peptide homologue G et surtout avec le peptide parent avec la même intensité (voir Figure 5).

II) Peptides hybrides du peptide 307-319 de l'hémagglutinine de la grippe

Les Inventeurs ont réalisé la synthèse, selon une méthode identique à celle
 10 précédemment décrite dans le cadre des peptides hybrides de l'histone H4, d'une autre série de peptides hybrides correspondant à un peptide T CD4⁺ dérivé de la nucléoprotéine du virus de la grippe (peptide HA 307-319 : Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr) qui entre dans la composition d'une préparation vaccinale synthétique testée à l'heure actuelle pour ses propriétés neutralisantes et
 15 protectrices.

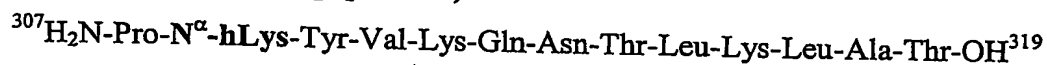
Les peptides synthétisés sont les suivants :

– SEQ ID NO : 16 (ou peptide A') :



$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1518.901$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ théorique = 1518.90079)

– SEQ ID NO : 17 (ou peptide B') :



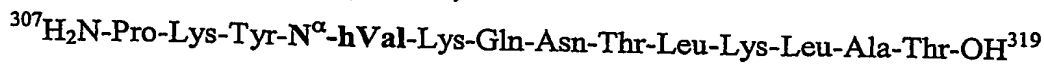
$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1518.9009$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ théorique = 1518.90079)

– SEQ ID NO : 18 (ou peptide C') :



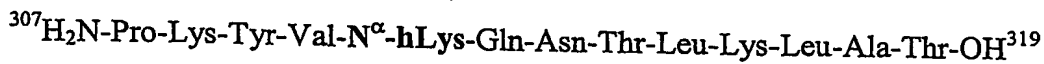
$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1518.9008$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ théorique = 1518.90079)

– SEQ ID NO : 19 (ou peptide D') :



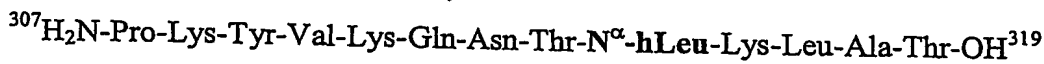
$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1518.9008$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ théorique = 1518.90079)

– SEQ ID NO : 20 (ou peptide E') :



$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1518.9009$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ théorique = 1518.90079)

– SEQ ID NO : 21 (ou peptide F') :



$[\text{M}+\text{H}]^+ = 1518.9008$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ théorique = 1518.90079)

– SEQ ID NO : 22 (ou peptide G') :

³⁰⁷H₂N-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-N^α-hLys-Leu-Ala-Thr-OH³¹⁹

[M+H]⁺ = 1518.9009([M+H]⁺ théorique = 1518.90079)

– SEQ ID NO : 23 (ou peptide H') :

³⁰⁷H₂N-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-N^α-hAsn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr-OH³¹⁹

[M+H]⁺ = ([M+H]⁺ théorique = 1518.90079)

– SEQ ID NO : 24 (ou peptide I') :

³⁰⁷H₂N-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-N^α-hLeu-Ala-Thr-OH³¹⁹

[M+Na]⁺ = 1540.8816([M+Na]⁺ théorique = 1540.88273)

– SEQ ID NO : 25 (ou peptide J') :

³⁰⁷H₂N-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-N^α-hAla-Thr-OH³¹⁹

[M+H+2Na]⁺ = 1562.8647([M+H+2Na]⁺ théorique = 1562.86468)

– SEQ ID NO : 26 (ou peptide K') :

³⁰⁷H₂N-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-N^α-hLys-N^α-hLeu-N^α-hAla-Thr-OH³¹⁹

[M+H]⁺ = 1548.9228 ([M+H]⁺ théorique = 1548.92259) .

– SEQ ID NO : 27 (ou peptide L') :

³⁰⁷H₂N-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-N^α-hLeu-N^α-hAla-Thr-OH³¹⁹

[M+H]⁺ = 1533.9090([M+H]⁺ théorique = 1533.91169).

Tout comme précédemment, les souris BALB/c ont été immunisées avec le peptide parent 307-319 HA et dans les cultures les lymphocytes T de ces souris ont été restimulés avec le même peptide ou avec les analogues. La prolifération cellulaire a été mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée et l'indice de prolifération (IS) par rapport aux puits sans peptide a été calculé. Les tests sont réalisés en triplicat et l'expérience est réalisée plusieurs fois dans des expériences indépendantes. Parmi les peptides analogues testés, les résultats montrent que le peptide J' (IS de 21.8 à 100 μM) a une activité nettement supérieure à celle du peptide parent (voir Figure 6).

Par ailleurs une expérience miroir de la précédente a été réalisée, à savoir une expérience sur des souris injectées avec les peptides modifiés et stimulation ex vivo avec le peptide parent (307-319). Donc, après injection du peptide analogue, des analyses ont été réalisées sur des cultures de cellules avec les différents analogues et le peptide parent 307-319. Parmi les peptides testés, on observe les résultats suivants :

1) les peptides L' et I' sont immunogènes (induisent des réponses contre le peptide homologue, et contre le peptide parent).

2) Le meilleur candidat est le peptide J', il est immunogène et les cellules T générées réagissent avec le peptide homologue J' et par réaction croisée avec le peptide parent. Cette réaction croisée est même supérieure à celle mesurée avec le peptide homologue (Figure 7). Nous retrouvons donc le peptide J qui croise parfaitement avec le peptide parent 307-319, ce qui confirme que le peptide modifié J' est donc un excellent candidat (voir Figure 7).

Légende des figures :

– Figure 1 : Tests de réponse sur les lymphocytes T de souris BALB/c injectées avec le peptide parent 88-99 de l'histone H4 en sous cutanée avec de l'adjuvant de Freund, et stimulation *ex-vivo* avec le peptide parent ou l'analogue E ; L'indice de stimulation est indiqué en ordonnée, et les différentes concentrations en peptide sont indiquées en abscisse.

– Figure 2 : Tests de réponse sur les lymphocytes T de souris BALB/c injectées avec le peptide modifié 88-99 A ou avec le peptide modifié 88-99 D de l'histone H4 en sous cutanée avec de l'adjuvant de Freund. L'indice de stimulation est indiqué en ordonnée, et les différentes concentrations en peptide sont indiquées en abscisse.

– Figure 3 : Tests de réponse sur les lymphocytes T de souris BALB/c injectées avec le peptide modifié 88-99 E de l'histone H4 en sous cutanée avec de l'adjuvant de Freund. L'indice de stimulation est indiqué en ordonnée, et les différentes concentrations en peptide sont indiquées en abscisse.

– Figure 4 : Tests de réponse sur les lymphocytes T de souris BALB/c injectées avec le peptide parent 88-99 de l'histone H4 en sous cutanée avec de l'adjuvant de Freund, et stimulation *ex vivo* avec le peptide parent ou l'analogue G. L'indice de stimulation est indiqué en ordonnée, et les différentes concentrations en peptide sont indiquées en abscisse.

– Figure 5 : Tests de réponse sur les lymphocytes T de souris BALB/c injectées avec le peptide modifié 88-99 G de l'histone H4 en sous cutanée avec de l'adjuvant de Freund. L'indice de stimulation est indiqué en ordonnée, et les différentes concentrations en peptide sont indiquées en abscisse.

– Figure 6 : Tests de réponse sur les lymphocytes T de souris BALB/c injectées avec le peptide parent 307-319 HA en sous cutanée avec de l'adjuvant de Freund, et stimulation *ex vivo* avec le peptide parent ou l'analogue J'. L'indice de stimulation est

indiqué en ordonnée, et les différentes concentrations en peptide sont indiquées en abscisse.

– Figure 7 : Tests de réponse sur les lymphocytes T de souris BALB/c immunisées avec le peptide analogue J en sous cutanée avec de l'adjuvant de Freund, et stimulation *ex vivo* avec le peptide parent et l'analogue J'. L'indice de stimulation est
5 indiqué en ordonnée, et les différentes concentrations en peptide sont indiquées en abscisse.

BIBLIOGRAPHIE

Appella, E.; Loftus, D.J.; Sakaguchi, K.; Celis, E. *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1996, 1, 177.

Mézière, C.; Viguière, M.; Dumortier, H.; Lo-Man, R.; Leclerc, C.; Guillet, J.G.;
15 Briand, J.P.; Muller, S. *J. Immunol.* 1997, 3230-3237.

Briand, J.P.; Benkirane, N.; Guichard, G.; Newman, J.F.E.; Van Regenmortel, M.H.V.; Brown, F.; Muller, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, 94, 12545-12550.

Liu, M.A. *Nat. Med.*, 1998, 4, Suppl. 5, 503.

Stemmer, C.; and Guichard, G. *Exp. Opin. Ther. Patents* 1998, 8, 819-830.

20 Ostankovitch, M, Guichard, G, Connan, F, Muller, S, Chaboissier, A, Hoebeke, J, Choppin, J, Briand, JP, Guillet, JG. *J Immunol* 1998; 161:200-8.

Petit, M.C.; Benkirane, N.; Guichard, G.; Phan Chan Du, A.; Marraud, M.; Cung, M.T.; Briand, J.P.; Muller, S. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 3686-3692.

25 Stemmer, C.; Quesnel, A.; Prévost-Blondel, A.; Zimmermann, C.; Muller, S.; Briand, J.P.; Pircher, H. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 5550-5555

Ben Yedidia, T., Beignon, AS, Partidos, CD, Muller, S. and Arnon, A. *Mol. Immunol.* 2002, 39, 323-331.

Phan-Chan Du, A., Limal, D., Semetey, V., Dali, H., Jolivet, M., Desgranges, C., Cung, MT, Briand, JP, Petit, MC and Muller, S. *J. Mol Biol.* 2002, 323, 503-521.

30 Decker, P., Le Moal, A., Briand, J.P., Muller, S. *J. Immunol.* 2000, 165, 654-662.

REVENDICATIONS

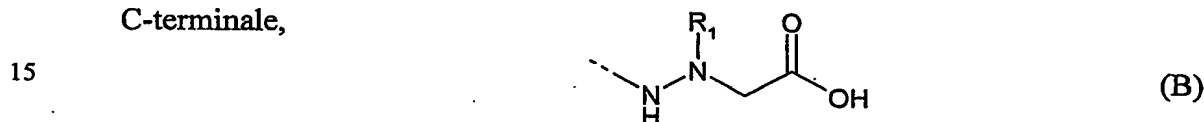
1. Utilisation de peptides hybrides analogues de peptides ou protéines parents,
 5 ces peptides hybrides comprenant au moins un résidu aza-β³ aminoacyle, à savoir :

* un résidu répondant à la formule (A) suivante lorsqu'il est situé en position N-terminale,



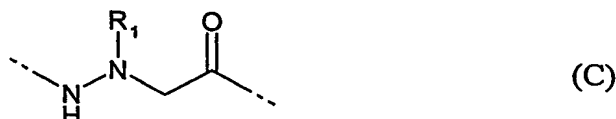
10 dans laquelle R représente H ou un groupe protecteur de la fonction amine des aminoacides, tels que Fmoc, Boc, ou Z, et R₁ représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

* un résidu répondant à la formule (B) suivante lorsqu'il est situé en position C-terminale,



dans laquelle R₁ représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

* un résidu répondant à la formule (C) suivante lorsqu'il est situé dans la chaîne
 20 desdits peptides hybrides,



dans laquelle R₁ représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides,

25 pour la préparation :

– d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies associées à la présence, dans l'organisme d'un individu, d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, ou

30 – d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies impliquant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et/ou les récepteurs des cellules T,

– d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un individu d'un anticorps susceptible d'être reconnu par un susdit peptide hybride,
ou pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* des pathologies
5 susmentionnées.

2. Utilisation selon la revendication 1, pour la préparation d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de pathologies d'origine virale ou bactérienne, ou de pathologies autoimmunes, ou de maladies neurodégénératives.
10

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'un vaccin ou d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des pathologies suivantes :

- les pathologies impliquant des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et/ou les récepteurs des cellules T,

- 15 • les maladies auto-immunes, et notamment la thyroïdite de Hashimoto, la maladie de Basedow, la maladie d'Addison, l'insuffisance hypophysaire, la gastrite de Biermer, certaines stérilités, le diabète juvénile de type 1, le syndrome de Goodpasture, la myasthénie, le rhumatisme articulaire aigu, le pemphigus, la pemphigoïde bulleuse, la dermatite herpétiforme, le vitiligo, le pelade, le psoriasis, l'ophtalmie sympathique, l'uvéite, le syndrome de Guillain-Baré, la sclérose en plaques, l'anémie hémolytique, le purpura thrombopénique idiopathique, la leucopénie idiopathique, la cirrhose biliaire primitive, l'hépatite chronique active, la rectocolite hémorragique, l'iléite de Crohn, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde, la dermatopolymyosite, la sclérodermie, la connectivite mixte, le lupus érythémateux discoïde, le lupus
20 érythémateux disséminé.

- les maladies neurodégénératives,

- les maladies d'origine virale, notamment :

- le SIDA provoqué par le virus de l'immuno-déficience humaine HIV-1 et HIV-2,

- 30 – la paraplégie associée à HTVL-1, ou la leucémie à cellules T de l'adulte, provoquée par le virus de la leucémie humaine à cellules T (virus HTLV),

- les infections provoquées par le virus respiratoire syncytial,

- les infections provoquées par le virus coxsakie, par exemple les méningites aiguës lymphocytaires,
- les infections provoquées par le virus d'Epstein-Barr, par exemple la mononucléose infectieuse,
- 5 – les infections provoquées par le cytomégalovirus, par exemple la maladie des inclusions cytomégaliqes,
- l'herpès provoqué par le virus de l'herpès humain,
- l'herpès provoqué par le virus 6 de l'herpès simplex,
- les infections provoquées par le parvovirus B19 humain, par exemple
- 10 les gastro-entérites infectieuses,
- l'hépatite B provoquée par le virus de l'hépatite B,
- l'hépatite C provoquée par le virus de l'hépatite C,
- la grippe provoquée par le virus influenza,
- la rubéole provoquée par le virus de la rubéole,
- 15 – les infections provoquées par le virus de la Dengue, par exemple les arboviroses,
- les rhumes, rhinites, coryza provoqués par les rhinovirus,
- la fièvre aphteuse provoquée par le virus de la fièvre aphteuse,
- certains cancers liés à des virus, tels que les virus Papilloma.

20 4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, de peptides hybrides de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- 25 – aa_1 , aa_n et aa_p représentent un résidu aminoacyle, ou un enchaînement de résidus aminoacyles, correspondant aux résidus aminoacyles présents aux mêmes positions dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,
- $N^{\alpha}haa_m$ et $N^{\alpha}haa_o$ représentent un résidu monomère aza- β^3 aminoacyle, ou un enchaînement de résidus monomères aza- β^3 aminoacyles, analogues aux résidus
- 30 aminoacyles initialement présents à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, lesdits monomères aza- β^3 aminoacyles répondant aux formules (A), (B), ou (C) indiquées dans la revendication 1, suivant qu'ils soient respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne

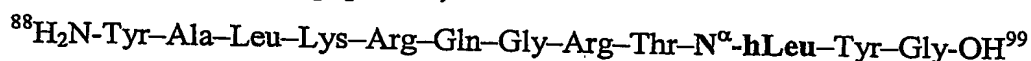
desdits peptides hybrides, et dans lesquelles R1 est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent lesdits monomères aza-β³ aminoacyles,

– l, m, n, o et p représentent zéro, ou un nombre entier compris entre 1 et 20, sous réserve que l'un au moins de m ou de o soit différent de zéro, et que le nombre minimum de résidus dans lesdits peptides hybrides de formule (I) soit de 4.

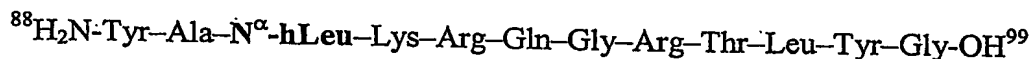
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, de peptides hybrides issus de l'épitope 88-99 de l'histone H4 à titre de peptide parent, et correspondant à SEQ ID NO : 1, dont l'un au moins des acides aminés initiaux est substitué par un résidu analogue aza-β³ aminoacide, pour la préparation d'un médicament, ou vaccin, destiné à la prévention ou au traitement du lupus érythémateux disséminé.

6. Utilisation selon la revendication 5, de peptides hybrides de formules suivantes :

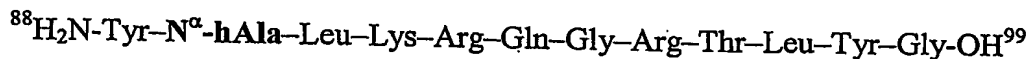
– SEQ ID NO : 2 (ou peptide E) :



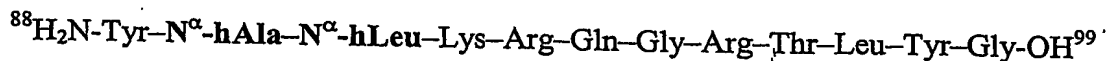
– SEQ ID NO : 3 (ou peptide C) :



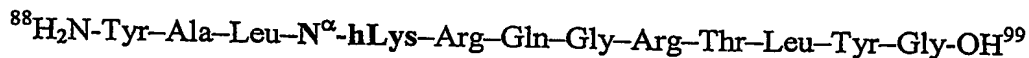
– SEQ ID NO : 4 (ou peptide A) :



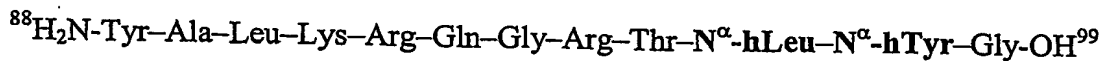
– SEQ ID NO : 5 (ou peptide B) :



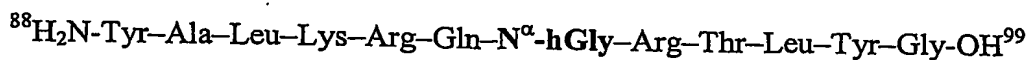
– SEQ ID NO : 6 (ou peptide D) :



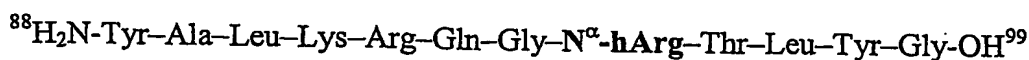
– SEQ ID NO : 7 (ou peptide G) :



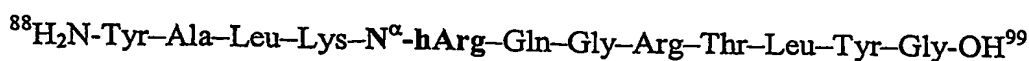
– SEQ ID NO : 8 :



– SEQ ID NO : 9 :



– SEQ ID NO : 10 :



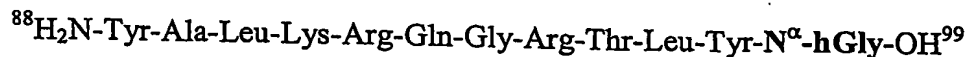
– SEQ ID NO : 11 :



– SEQ ID NO : 12 :



5 – SEQ ID NO : 13 :



– SEQ ID NO : 14 :



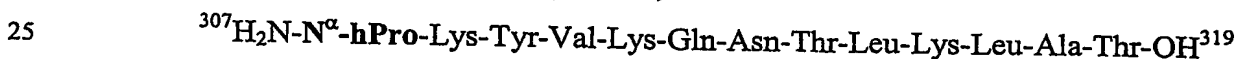
10 7. Utilisation selon la revendication 5 ou 6, du peptide hybride de formule SEQ ID NO : 2, ou du peptide hybride de formule SEQ ID NO : 7.

15 8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, de peptides hybrides issus du peptide 307-319 de l'hémagglutinine du virus de la grippe à titre de peptide parent, et correspondant à SEQ ID NO : 15, dont l'un au moins des aminoacides initiaux est substitué par un résidu analogue aza- β^3 aminoacide, pour la préparation d'un médicament, ou vaccin, destiné à la prévention ou au traitement de la grippe ou de toute autre pathologie pour laquelle une molécule contenant un épitope B ou CTL (CD8) est administrée en association avec la séquence 307-319 HA qui renferme un épitope T

20 CD4 dit universel.

9. Utilisation selon la revendication 8, de peptides hybrides de formules suivantes :

– SEQ ID NO : 16 (ou peptide A') :



– SEQ ID NO : 17 (ou peptide B') :



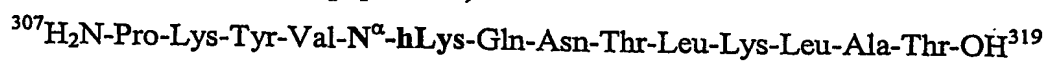
– SEQ ID NO : 18 (ou peptide C') :



30 – SEQ ID NO : 19 (ou peptide D') :



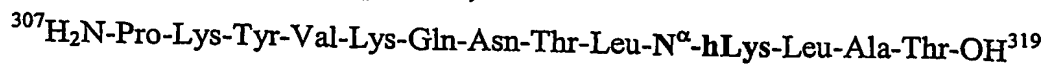
– SEQ ID NO : 20 (ou peptide E') :



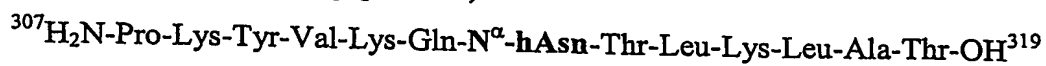
– SEQ ID NO : 21 (ou peptide F') :



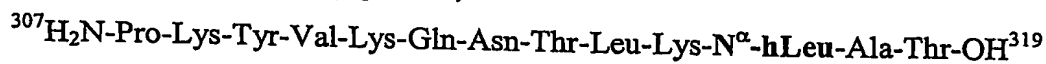
– SEQ ID NO : 22 (ou peptide G') :



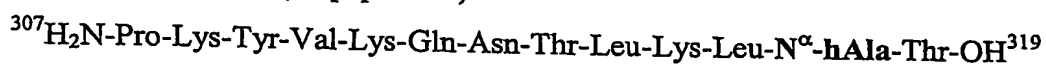
– SEQ ID NO : 23 (ou peptide H') :



– SEQ ID NO : 24 (ou peptide I') :



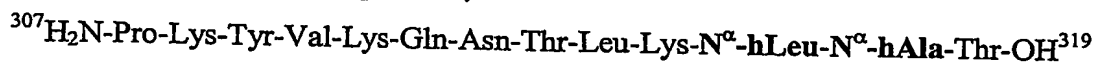
– SEQ ID NO : 25 (ou peptide J') :



– SEQ ID NO : 26 (ou peptide K') :



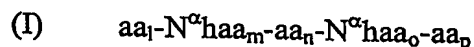
– SEQ ID NO : 27 (ou peptide L') :



10. Utilisation selon la revendication 8 ou 9, du peptide hybride de formule SEQ ID NO : 25.

11. Peptides hybrides comprenant au moins un aza- β^3 aminoacide, ces peptides hybrides étant des analogues de peptides ou protéines parents, lesdits peptides hybrides comprenant au moins un aminoacide initial du peptide ou de la protéine parent.

12. Peptides hybrides selon la revendication 11, de formule (I) suivante :



dans laquelle :

– aa_1 , aa_n et aa_p représentent un résidu aminoacyle, ou un enchaînement de résidus aminoacyles, correspondant aux résidus aminoacyles présents aux mêmes positions dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus,

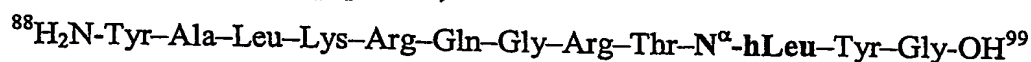
– $\text{N}^\alpha\text{haa}_m$ et $\text{N}^\alpha\text{haa}_o$ représentent un résidu monomère aza- β^3 aminoacyle, ou un enchaînement de résidus monomères aza- β^3 aminoacylés, analogues aux résidus aminoacyles initialement présents à la même position dans le peptide ou la protéine parent dont les peptides hybrides sont issus, lesdits monomères aza- β^3 aminoacyles répondant aux formules (A), (B), ou (C) indiquées dans la revendication 1, suivant

qu'ils soient respectivement en position N-terminale, C-terminale, ou dans la chaîne desdits peptides hybrides, et dans lesquelles R_1 est identique à la chaîne latérale de l'acide aminé initial du peptide ou de la protéine parent auquel correspondent lesdits monomères aza- β^3 aminoacyles,

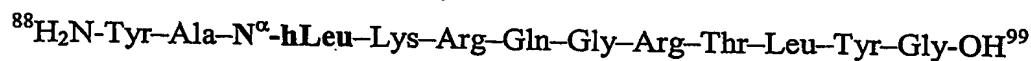
- 5 – l, m, n, o et p représentent zéro, ou un nombre entier compris entre 1 et 20, sous réserve que l'un au moins de m ou de o soit différent de zéro, que le nombre minimum de résidus dans lesdits peptides hybrides de formule (I) soit de 4, et l'un au moins de l, n, ou p soit différent de zéro.

10 13. Peptides hybrides selon la revendication 11 ou 12, de formules suivantes :

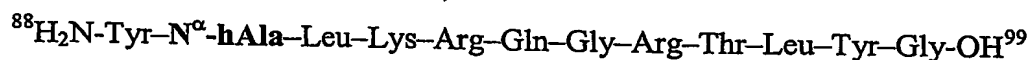
– SEQ ID NO : 2 (ou peptide E) :



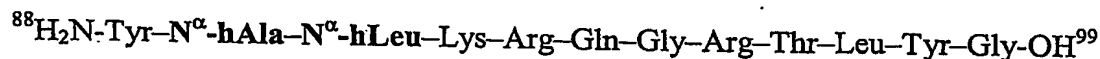
– SEQ ID NO : 3 (ou peptide C) :



15 – SEQ ID NO : 4 (ou peptide A) :



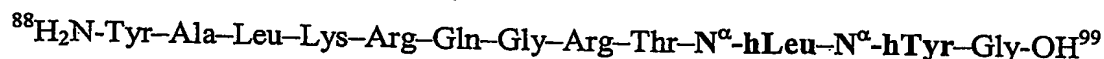
– SEQ ID NO : 5 (ou peptide B) :



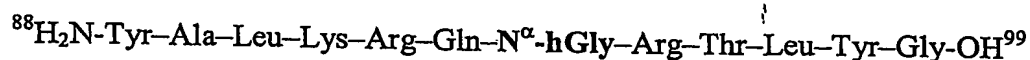
– SEQ ID NO : 6 (ou peptide D) :

20 $^{88}\text{H}_2\text{N-Tyr-Ala-Leu-N}^\alpha\text{-hLys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-OH}^{99}$

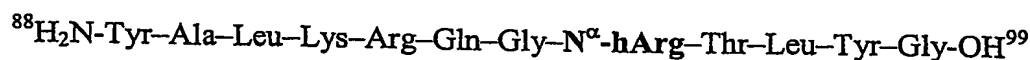
– SEQ ID NO : 7 (ou peptide G) :



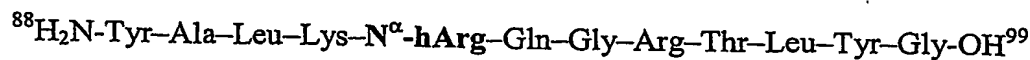
– SEQ ID NO : 8 :



25 – SEQ ID NO : 9 :



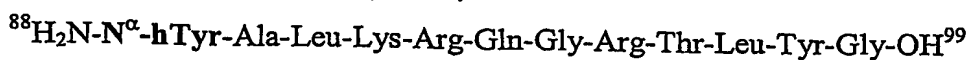
– SEQ ID NO : 10 :



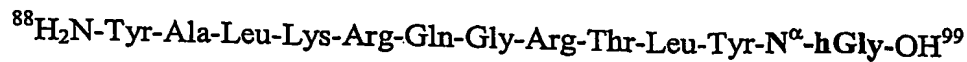
– SEQ ID NO : 11 :

30 $^{88}\text{H}_2\text{N-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-N}^\alpha\text{-hTyr-Gly-OH}^{99}$

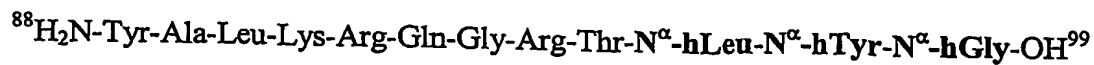
– SEQ ID NO : 12 (ou peptide F):



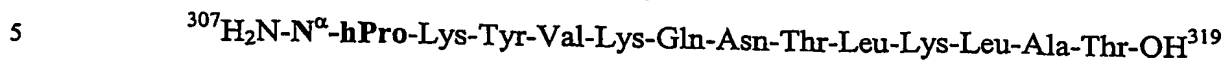
– SEQ ID NO : 13 (ou peptide H):



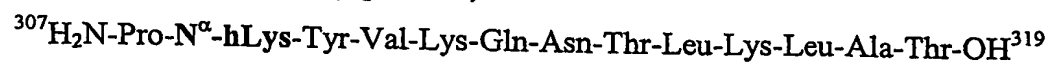
– SEQ ID NO : 14 (ou peptide I):



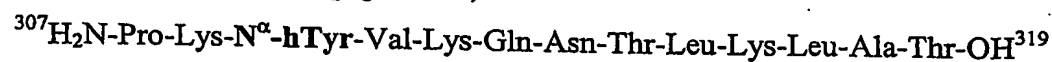
– SEQ ID NO : 16 (ou peptide A') :



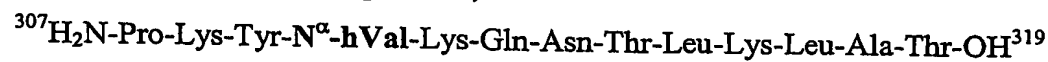
– SEQ ID NO : 17 (ou peptide B') :



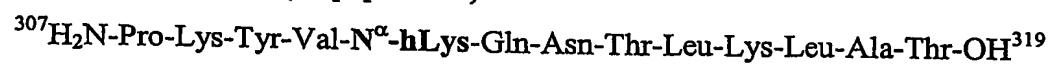
– SEQ ID NO : 18 (ou peptide C') :



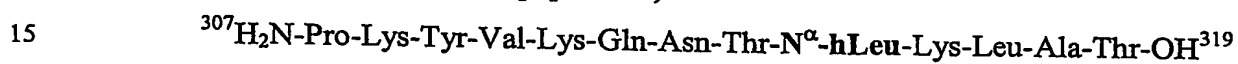
10 – SEQ ID NO : 19 (ou peptide D') :



– SEQ ID NO : 20 (ou peptide E') :



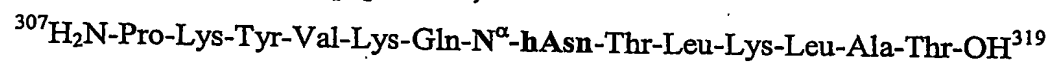
– SEQ ID NO : 21 (ou peptide F') :



– SEQ ID NO : 22 (ou peptide G') :



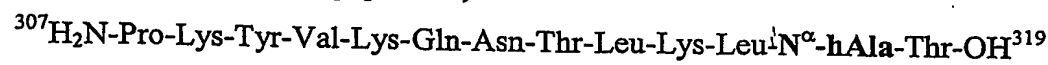
– SEQ ID NO : 23 (ou peptide H') :



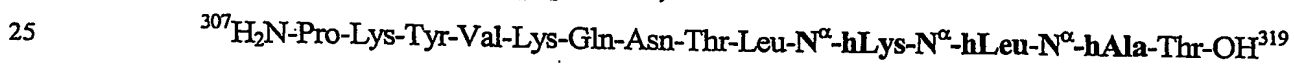
20 – SEQ ID NO : 24 (ou peptide I') :



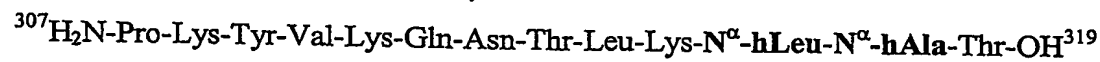
– SEQ ID NO : 25 (ou peptide J') :



– SEQ ID NO : 26 (ou peptide K') :

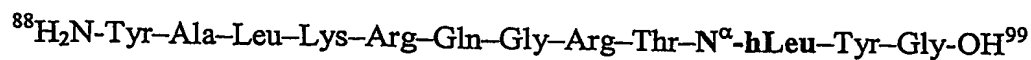


– SEQ ID NO : 27 (ou peptide L') :

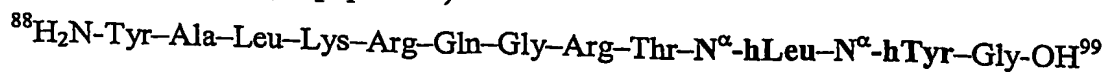


14. Peptides hybrides selon l'une des revendications 11 à 13, de formules
suivantes :

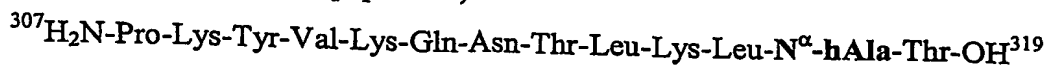
– SEQ ID NO : 2 (ou peptide E) :



– SEQ ID NO : 7 (ou peptide G) :



– SEQ ID NO : 25 (ou peptide J') :



5

15. Anticorps anti-peptides hybrides polyclonaux ou monoclonaux tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un peptide hybride défini dans l'une des revendications 1 à 14, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces peptides hybrides, et/ou avec les peptides ou protéines parents correspondant à ces derniers, et caractérisés en ce qu'ils reconnaissent le peptide parent ou la protéine parente avec une affinité au moins égale à celle présentée par les anticorps anti-peptide parent ou anti-protéine parente vis à vis du peptide parent ou de la protéine parente.

10

15

16. Anticorps anti-idiotypes susceptibles de former un complexe avec les anticorps selon la revendication 15, tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec lesdits anticorps selon la revendication 15.

20

17. Complexe entre un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 14, et un élément du complexe d'histocompatibilité majeur (encore désigné complexe MHC-hybride), et éventuellement un récepteur de cellules T (encore désigné complexe MHC-hybride-récepteur T).

25

18. Complexe entre un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 14, et un récepteur de cellules T.

30

19. Méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient, d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, caractérisée en ce qu'elle comprend :

– la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient susceptible d'être porteur d'anticorps dirigés contre ladite protéine, avec un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 14, ledit peptide hybride étant issu de tout ou partie de ladite protéine endogène ou exogène, ou issu d'un peptide

susceptible d'être reconnu par des anticorps reconnaissant eux-mêmes la protéine exogène ou endogène,

dans des conditions permettant la réaction entre les anticorps dirigés contre la protéine et susceptibles d'être présents dans l'échantillon biologique, et le susdit peptide hybride,

– la détection *in vitro* du complexe antigène / anticorps susceptible d'être formé à l'étape précédente ou

– la détection *in vitro* d'anticorps circulants chez le patient par un test de compétition en utilisant un anticorps anti-hybride.

20. Méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient d'une protéine exogène ou endogène, susceptible d'être directement ou indirectement impliquée dans le processus d'apparition et/ou de développement de ces pathologies, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comprend :

– la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient susceptible d'être porteur de ladite protéine, avec l'un au moins des anticorps selon la revendication 15, les anticorps étant avantageusement dirigés contre un peptide hybride issu de tout ou partie de ladite protéine endogène ou exogène, ou

dans des conditions permettant la réaction entre la protéine susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et les susdits anticorps dirigés contre le susdit peptide hybride;

– la détection *in vitro* du complexe antigène / anticorps susceptible d'être formé à l'étape précédente, ou

– la détection d'antigènes circulants chez le patient dans des tests de compétition en utilisant un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 14.

21. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic *in vitro* selon la revendication 19 ou 20, comprenant :

– un peptide hybride issu de tout ou partie de la protéine endogène ou exogène, ou correspondant à un peptide susceptible d'être reconnu par des anticorps reconnaissant eux-mêmes la protéine exogène ou endogène, ou bien des anticorps selon la revendication 15, dirigés contre ce peptide hybride;

– des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique;

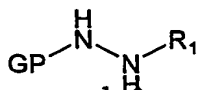
– des réactifs permettant de détecter le complexe antigène / anticorps qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où le peptide hybride ou les anticorps anti-hybrides susmentionnés ne sont pas marqués.

22. Composition pharmaceutique, notamment vaccin, caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 14, ou un anti-idiotype selon la revendication 16, en association ou non avec un véhicule physiologiquement acceptable.

23. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide hybride tel que défini dans l'une des revendications 1 à 14, ou un anticorps anti-idiotype selon la revendication 16, associés à une molécule porteuse, protéique ou non, pouvant induire *in vivo* la production d'anticorps neutralisant la protéine exogène ou endogène responsable de la pathologie, ou induire *in vivo* une réponse immune cellulaire cytotoxique ou auxiliaire.

24. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps selon la revendication 15, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

25. Procédé de préparation d'aza- β^3 aminoacides caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de l'hydrazine substituée et protégée de formule (D) suivante :

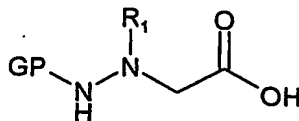


(D)

dans laquelle R_1 représente une chaîne latérale choisie parmi celles des aminoacides, le cas échéant protégée, et GP un groupe protecteur des fonctions amines, tels que Boc, Fmoc, ou Z,

avec de l'acide glyoxylique sous agitation en présence de NaBH_3CN en milieu acide,

ce qui conduit en une étape au composé aza- β^3 aminoacide de formule



dans laquelle R_1 et GP sont tels que définis ci-dessus, ledit composé pouvant le cas échéant être déprotégé, notamment à l'aide de HCl, de pipéridine, ou d'hydrogène palladié, afin d'éliminer le groupe GP et le remplacer par H.

26. Aza- β^3 aminoacides de formules suivantes :

Fmoc aza- β^3 -Glycine (Fmoc- $\text{N}^{\alpha}\text{hGly-OH}$),

Fmoc aza- β^3 -Lysine (Fmoc- $\text{N}^{\alpha}\text{hLys(Boc)-OH}$),

Fmoc -aza- β^3 -Aspartique acide (Fmoc- $\text{N}^{\alpha}\text{hAsp(OtBu)-OH}$),

Fmoc aza- β^3 -Methionine (Fmoc- $\text{N}^{\alpha}\text{hMet-OH}$),

Fmoc aza- β^3 Arginine (Fmoc- $\text{N}^{\alpha}\text{hArg (Boc)-OH}$),

Fmoc aza- β^3 -Tyrosine (Fmoc- $\text{N}^{\alpha}\text{hTyr(OCH}_2\text{OEt)-OH}$),

Fmoc aza- β^3 Asparagine (Fmoc- $\text{N}^{\alpha}\text{hAsn (Trt)-OH}$),

Fmoc aza- β^3 Proline (Fmoc- $\text{N}^{\alpha}\text{hPro-OH}$).

1/7

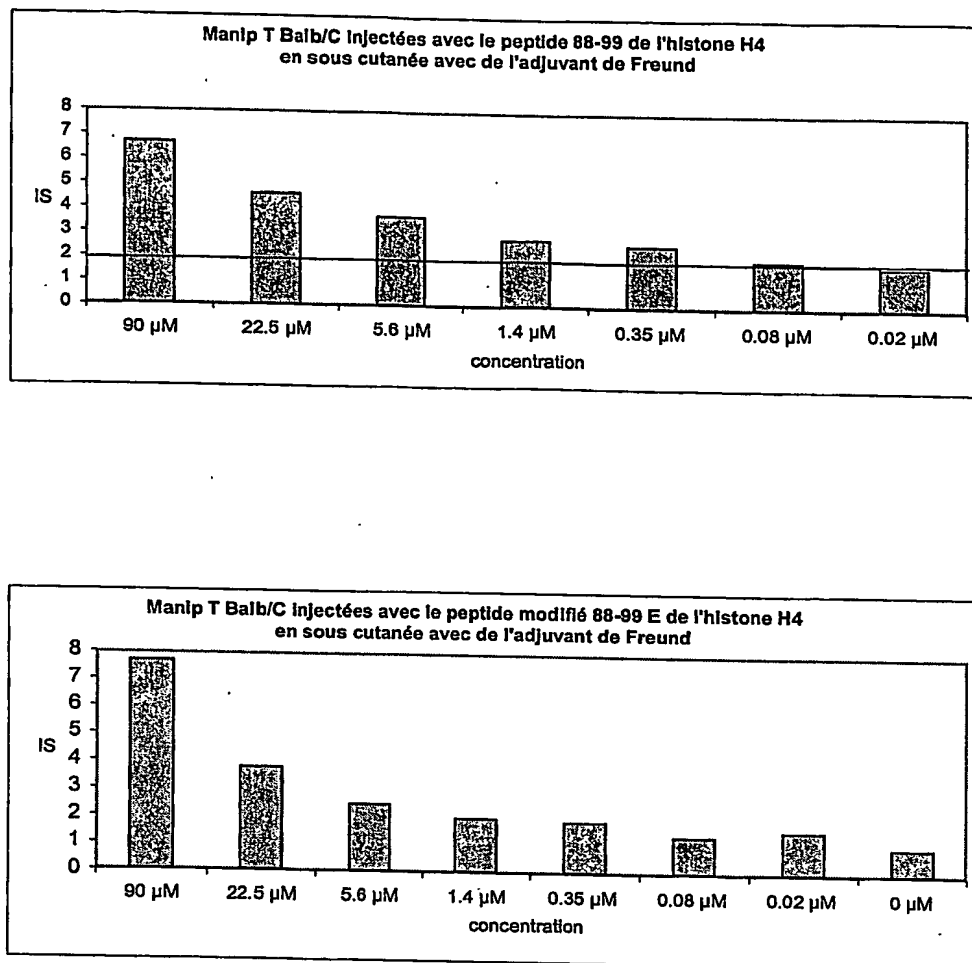


Figure 1

2/7

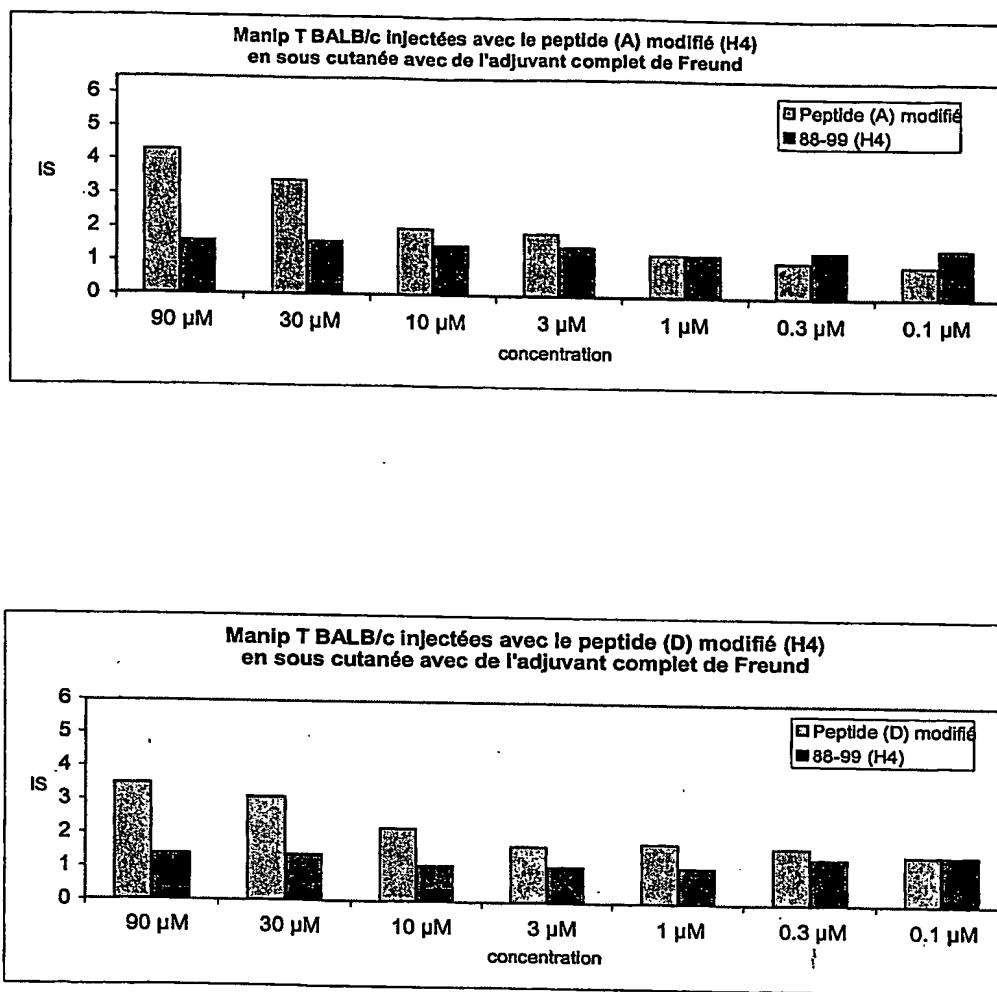


Figure 2

3/7

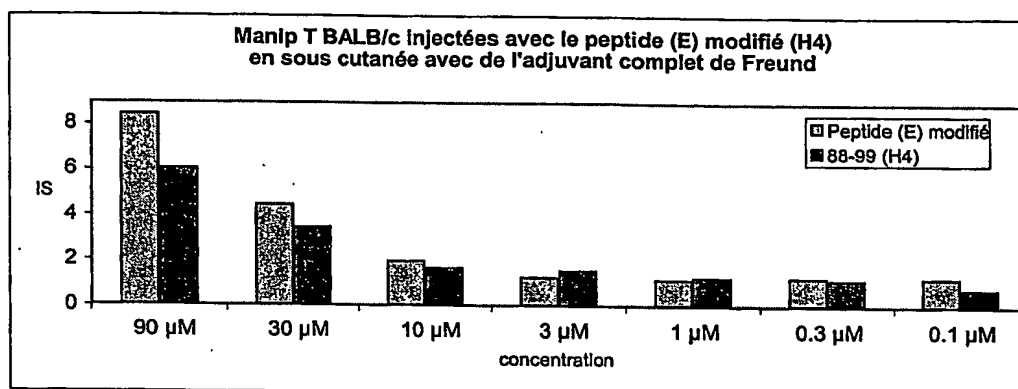


Figure 3

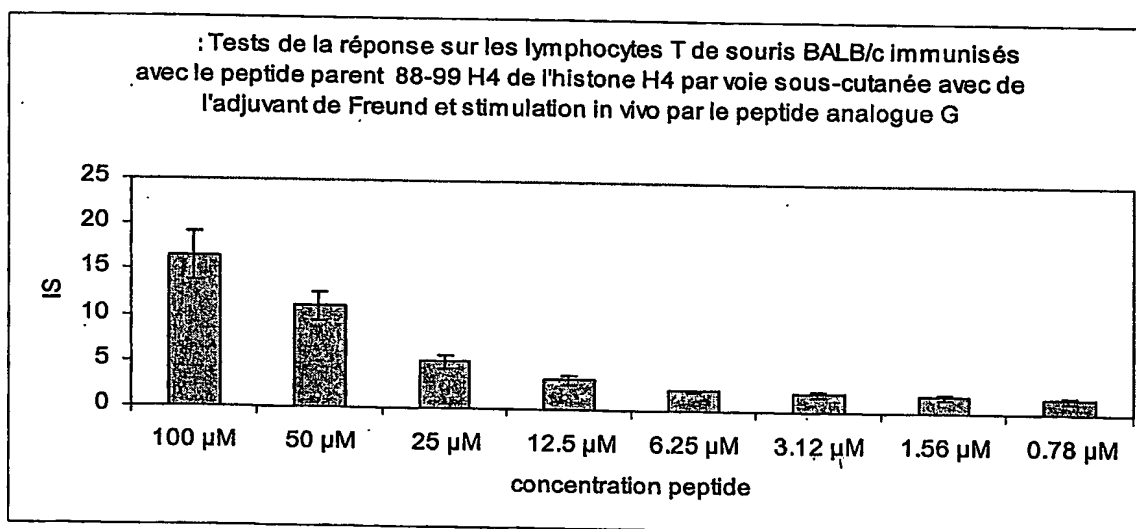
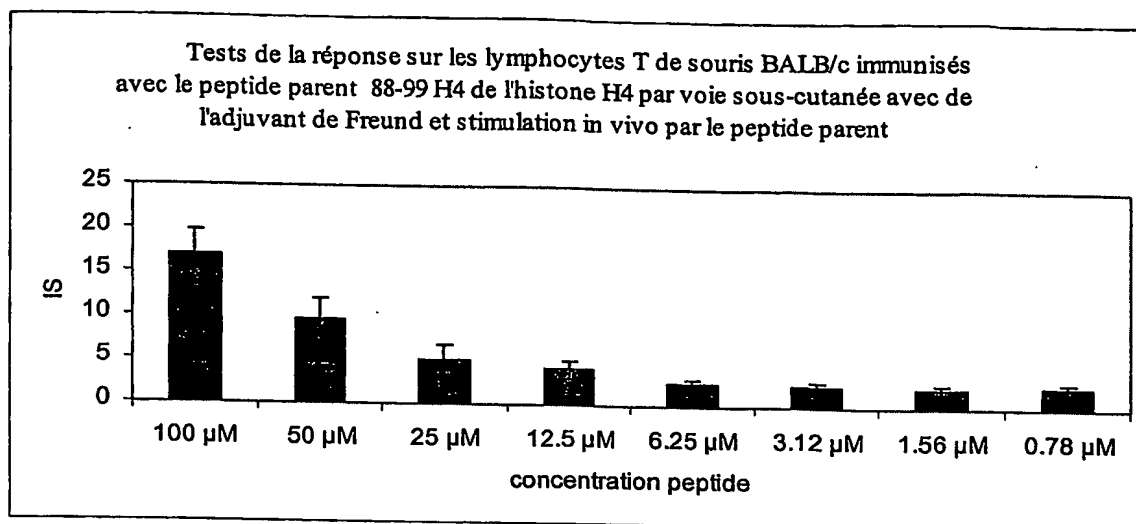


FIGURE 4

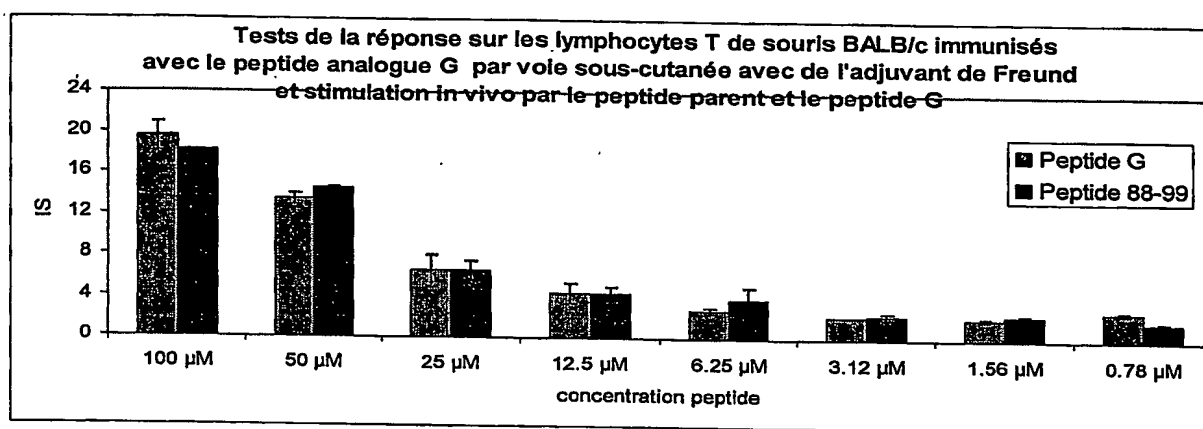


FIGURE 5

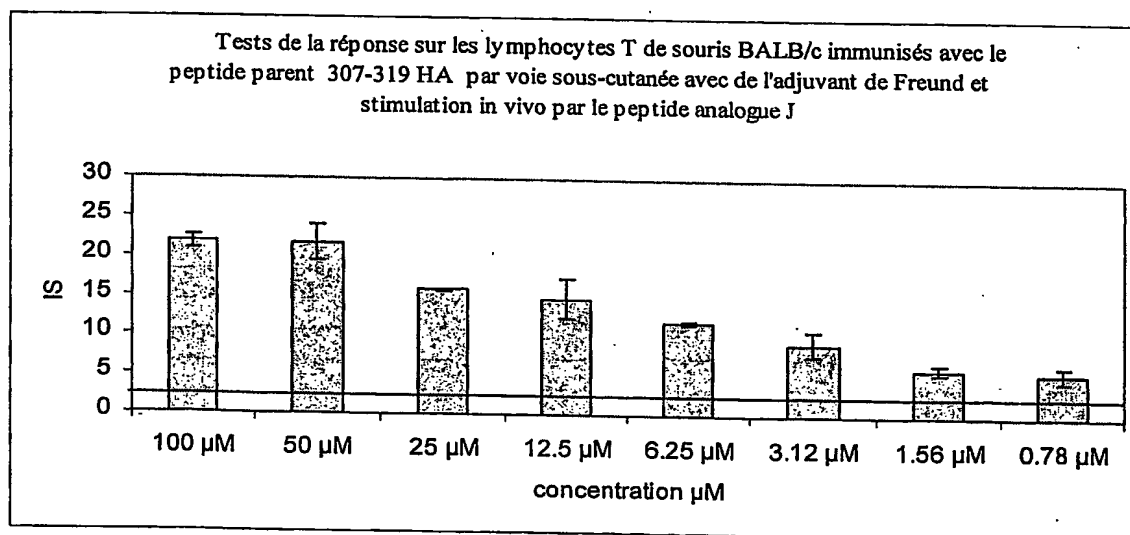
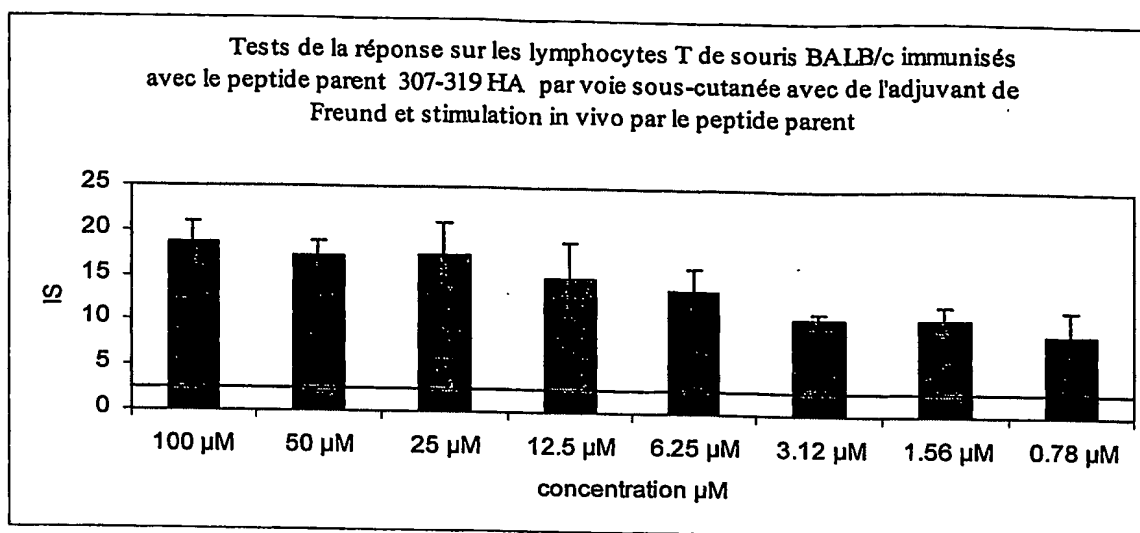


FIGURE 6

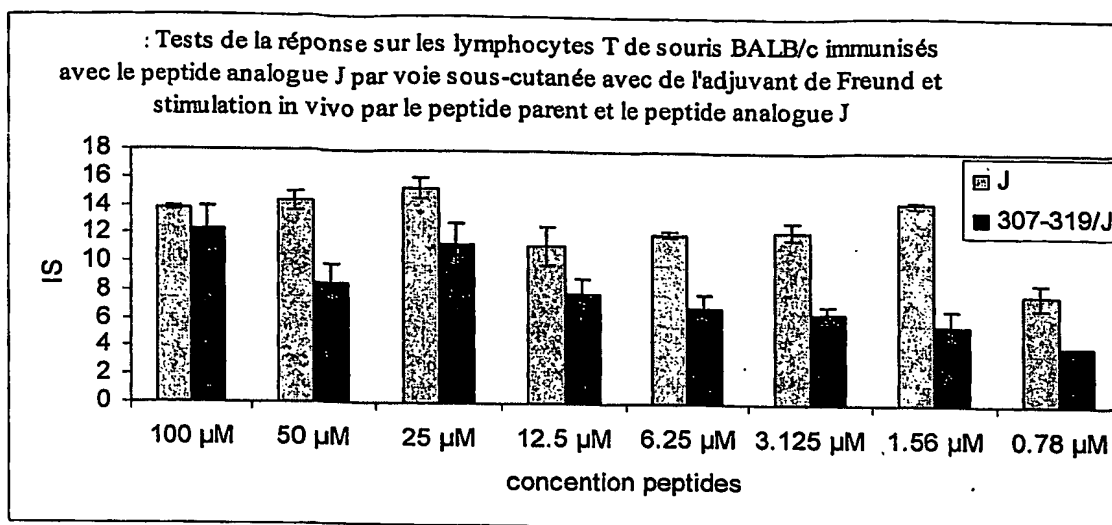


FIGURE 7

LISTE DE SÉQUENCES

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> ANALOGUES PEPTIDIQUES COMPRENANT AU MOINS UN RESIDU
AZA- β 3-AMINOACYLE, ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT EN THERAPIE

<130> WOB 03 AQ CNR AZA3

<150> FR 03/06992

<151> 2003-06-11

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1
Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Peptide hybride

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Nalpha-hLeucine

<400> 2
Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Xaa Tyr Gly
1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Peptide hybride

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Nalpha-hLeucine

<400> 3
Tyr Ala Xaa Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Nalpha-hAlanine

<400> 4
Tyr Xaa Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Nalpha-hAlanine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Nalpha-hLeucine

<400> 5
Tyr Xaa Xaa Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Nalpha-hLysine

<400> 6
Tyr Ala Leu Xaa Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Nalpha-hLeucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Nalpha-hTyrosine

<400> 7
Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Xaa Xaa Gly
1 5 10

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Nalpha-hGlycine

<400> 8
Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Xaa Arg Thr Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Nalpha-hArginine

<400> 9
Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Xaa Thr Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Nalpha-hArginine

<400> 10
Tyr Ala Leu Lys Xaa Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Nalpha-hTyrosine

<400> 11
Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Xaa Gly
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Nalpha-hTyrosine

<400> 12
Xaa Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> peptide hybride

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Nalpha-hGlycine

<400> 13

Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Leu Tyr Xaa
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> peptide hybride

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Nalpha-hLeucine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Nalpha-hTyrosine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Nalpha-hGlycine

<400> 14

Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg Thr Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> peptide hybride

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Nalpha-hProline

<400> 16

Xaa Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> peptide hybride

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Nalpha-hLysine

<400> 17

Pro Xaa Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> peptide hybride

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Nalpha-hTyrosine

<400> 18

Pro Lys Xaa Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> peptide hybride

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Nalpha-hValine

<400> 19

Pro Lys Tyr Xaa Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Nalpha-hLysine

<400> 20
Pro Lys Tyr Val Xaa Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Nalpha-hLeucine

<400> 21
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Xaa Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Nalpha-hLysine

<400> 22
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Xaa Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Nalpha-hAsparagine

<400> 23
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Xaa Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Nalpha-hLeucine

<400> 24
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Xaa Ala Thr
1 5 10

<210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Nalpha-hAlanine

<400> 25
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Xaa Thr
1 5 10

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Nalpha-hLysine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Nalpha-hLeucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Nalpha-hAlanine

<400> 26
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Xaa Xaa Xaa Thr
1 5 10

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> peptide hybride

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Nalpha-hLeucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Nalpha-hAlanine

<400> 27
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Xaa Xaa Thr
1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/001467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 828 884 A (CENTRE NAT RECH SCIENT)	
Y	28 February 2003 (2003-02-28)	
	the whole document	1-4,11, 12,15-25 5-7,13, 14
Y	DECKER P ET AL.: "Identification of a Minimal T Cell Epitope Recognized by Antinucleosome Th Cells in the C-Terminal Region of Histone H4" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 165, no. 2, 2000, pages 654-662, XP002277566 the whole document	5-7,13, 14

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 February 2005

Date of mailing of the international search report

18-07-2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmidt, Harald

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/001467

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEGUILLAUME ARNAUD ET AL: "Solution synthesis and characterization of aza-.beta.3-peptides (N.alpha.-substituted hydrazino acetic acid oligomers)" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, US, vol. 66, 2001, pages 4923-4929, XP002197673 ISSN: 0022-3263	1-4,11, 12
Y	the whole document	5-7,13, 14
A	----- CA 2 097 533 A (LEMAIRE SIMON) 4 December 1993 (1993-12-04) * SEQ ID NO:40, pages 1 et 2, les revendications *	
A	----- US 2003/021797 A1 (DATTA SYAMAL K ET AL) 30 January 2003 (2003-01-30) page 1 - page 3; claims 1-5,13-15,22,24-26; figures 17,19A,19B,20-22	
T	----- BOUGET K ET AL: "HYDRAZINO-AZA AND N-AZAPEPTOIDS WITH THERAPEUTIC POTENTIAL AS ANTICANCER AGENTS" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 11, no. 23, 17 November 2003 (2003-11-17), pages 4881-4889, XP001187599 ISSN: 0968-0896 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR2004/001467

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 5-7 (in full) and claims 1-4 and 11-25 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2004/001467

Continuation of Box III

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 5-7 (in full) and claims 1-4 and 11-25 (in part)

Hybrid peptides from the 88-99 epitope of histone H4, in which at least one of the initial amino acids is substituted by an aza- β^3 amino acid analogue residue; compositions that include them, antibodies, complexes, uses and methods.

2. Claims 8-10 (in full) and claims 1-4 and 11-25 (in part)

Hybrid peptides from the 307-319 epitope of flu virus hemagglutinin, in which at least one of the initial amino acids is substituted by an aza- β^3 amino acid analogue residue; compositions that include them, antibodies, complexes, uses and methods.

3. Claim 26

Aza- β^3 amino acids.

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/001467

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2828884	A	28-02-2003	FR 2828884 A1	28-02-2003
			CA 2430267 A1	06-03-2003
			EP 1421065 A1	26-05-2004
			WO 03018557 A1	06-03-2003
			JP 2005501121 T	13-01-2005
			US 2004142851 A1	22-07-2004
CA 2097533	A	04-12-1993	CA 2097533 A1	04-12-1993
US 2003021797	A1	30-01-2003	US 6468537 B1	22-10-2002
			AU 4676500 A	10-11-2000
			WO 0064466 A1	02-11-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2004/001467

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/47

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 828 884 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 28 février 2003 (2003-02-28)	1-4, 11, 12, 15-25
Y	le document en entier	5-7, 13, 14
Y	DECKER P ET AL.: "Identification of a Minimal T Cell Epitope Recognized by Antinucleosome Th Cells in the C-Terminal Region of Histone H4" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 165, no. 2, 2000, pages 654-662, XP002277566 le document en entier	5-7, 13, 14
	----- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 février 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18-07-2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schmidt, Harald

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2004/001467

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEGUILLAUME ARNAUD ET AL: "Solution synthesis and characterization of aza-.beta.3-peptides (N.alpha.-substituted hydrazino acetic acid oligomers)" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, US, vol. 66, 2001, pages 4923-4929, XP002197673 ISSN: 0022-3263	1-4,11, 12
Y	le document en entier	5-7,13, 14
A	----- CA 2 097 533 A (LEMAIRE SIMON) 4 décembre 1993 (1993-12-04) * SEQ ID NO:40, pages 1 et 2, les revendications *	
A	----- US 2003/021797 A1 (DATTA SYAMAL K ET AL) 30 janvier 2003 (2003-01-30) page 1 - page 3; revendications 1-5,13-15,22,24-26; figures 17,19A,19B,20-22	
T	----- BOUGET K ET AL: "HYDRAZINO-AZA AND N-AZAPEPTOIDS WITH THERAPEUTIC POTENTIAL AS ANTICANCER AGENTS" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 11, no. 23, 17 novembre 2003 (2003-11-17), pages 4881-4889, XP001187599 ISSN: 0968-0896 le document en entier -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2004/001467

Cadre II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os} 5-7 (complètement) et 1-4, 11-25 (partiellement)

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 5-7 (complètement) et 1-4,11-25 (partiellement)

peptides hybrides issus de l'épitope 88-99 de l'histone H4, dont l'un au moins des aminoacides initiaux est substitué par un résidu analogue aza-beta3 aminoacide, leurs compositions, anticorps, complexes, utilisations et méthodes

2. revendications: 8-10 (complètement) et 1-4,11-25 (partiellement)

peptides hybrides issus du peptide 307-319 de l'hémagglutinine du virus de la grippe, dont l'un au moins des aminoacides initiaux est substitué par un résidu analogue aza-beta3 aminoacide, leurs compositions, anticorps, complexes, utilisations et méthodes

3. revendication: 26

aza-.beta.-3 aminoacides

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2828884 A	28-02-2003	FR 2828884 A1	28-02-2003
		CA 2430267 A1	06-03-2003
		EP 1421065 A1	26-05-2004
		WO 03018557 A1	06-03-2003
		JP 2005501121 T	13-01-2005
		US 2004142851 A1	22-07-2004
CA 2097533 A	04-12-1993	CA 2097533 A1	04-12-1993
US 2003021797 A1	30-01-2003	US 6468537 B1	22-10-2002
		AU 4676500 A	10-11-2000
		WO 0064466 A1	02-11-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.